

**Untersuchungen zur Aufklärung des Prä-mRNA Spleißvorgangs in der Spaltheife  
*Schizosaccharomyces pombe*: Genetische und biochemische Charakterisierung der  
Interaktionen des *prp4* Gens**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Kathrin Richert

aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Norbert F. Käufer
  2. Referent: Prof. Dr. Henning Schmidt
- eingereicht am: 13.05.2002  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.07.2002

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Norbert F. Käufer, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Schmidt, H., Richert, K., Drakas, R. A., & Käufer, N. F. (1999). *spp42*, identified as a classical suppressor of *prp4-73*, which encodes a kinase involved in pre-mRNA splicing in fission yeast, is a homologue of the splicing factor Prp8p. *Genetics*, 153, 1183-1191.

Schwelnus, W., Richert, K., Opitz, F., Groß, T., Habara, Y., Tani, T., & Käufer, N. F. (2001). Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBOreports*, 2 (1), 35-41.

Richert, K., Schmidt, H., Groß, T., & Käufer, N. F. (2002). The deubiquitinating enzyme Ubp21p of fission yeast stabilizes a mutant form of protein kinase Prp4p. *Mol. Genet. Gen.*, 267, 88-95.

### **Tagungsbeiträge**

Käufer, N. F., Richert, K., Schwelnus, W., Zock-Emmenthal, S., & Groß, T. (1999). Prp4p kinase and splicing control. First International Fission Yeast Meeting, 25. – 30.09.1999, Edinburgh, UK.

Richert, K., Schwelnus, W., & Käufer, N. F. (2000). The Connection between pre-mRNA splicing and cell cycle? Frühjahrsakademie der Gesellschaft für Genetik, 07. – 09.04.2000, Wittenberg, Deutschland.

Richert, K., Schwelnus, W., & Käufer, N. F. (2000). Prp4p kinase and splicing control in fission yeast. 16. Yeast Meeting, 05. – 07.10.2000, Ober-Ramstadt, Deutschland.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	3
2.1	Ziel dieser Arbeit	7
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	9
3.1	Genetische Interaktionspartner der Prp4p Proteinkinase	9
3.1.1	<i>cdc5-120<sup>ts</sup></i> interagiert genetisch mit <i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	13
3.1.2	<i>prp5-1<sup>ts</sup></i> interagiert genetisch mit <i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	14
3.1.3	<i>prp5-1<sup>ts</sup></i> interagiert genetisch mit <i>cdc5-120<sup>ts</sup></i>	16
3.1.4	<i>prp10-1<sup>ts</sup></i> interagiert genetisch mit <i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	17
3.1.5	<i>prp10-1<sup>ts</sup></i> interagiert genetisch mit <i>prp5-1<sup>ts</sup></i> und auch mit <i>cdc5-120<sup>ts</sup></i>	18
3.1.6	<i>prp8/cdc28-P8<sup>ts</sup></i> interagiert nicht mit <i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	19
3.1.7	<i>prp1-ts</i> -Mutanten interagieren mit <i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	21
3.2	Extrogene Suppressoren der Prp4p Proteinkinase	23
3.2.1	Suche nach extragenen Suppressoren der Prp4p Kinase	24
3.2.2	Nachweis zweier unabhängiger extragener Suppressoren von <i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	25
3.2.3	Die extragenen Suppressoren unterdrücken den Spleißdefekt des <i>prp4-73<sup>ts</sup></i> -Allels	27
3.2.4	Bestimmung der Kopplungsgruppe von <i>spp41</i> und <i>spp42</i>	28
3.2.5	Bestimmung der Genabstände zwischen den Suppressorloci und den Markergenen	32
3.2.6	Identifizierung der Suppressoren	37
3.2.7	Vergleich der Abstände zwischen <i>spp42</i> und den Markergenen mit den Sequenzabständen der Gene in der Datenbank	41
3.3	High-Copy-Suppressor der Prp4p Proteinkinase	42
3.3.1	Regulation der Prp4p Kinaseaktivität über den Zellzyklus?	42
3.3.2	Eine Dreifach-Mutation im ALKHP-Motiv komplementiert nicht das <i>prp4-73<sup>ts</sup></i> -Allel	46
3.3.3	Isolierung eines High-Copy-Suppressors von der Prp4p Proteinkinase	49
3.3.4	Ubp21p ist ein aktives Deubiquitinierungsenzym	50

3.3.5	Prp4p-SSKLP ist instabiler als Prp4p <sup>+</sup>	52
3.3.6	Ubp21p stabilisiert Prp4p-SSKLP	54
<b>4</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Die Funktion der Interaktionspartner von Prp4p	57
4.2	Prp1p ist ein physiologisches Substrat der Prp4p Kinase	61
4.3	Zwei Modelle der Kontrollfunktion von Prp4p im Prä-mRNA-Spleißvorgang	66
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>69</b>
5.1	Geräte	69
5.2	Chemikalien	69
5.3	Medien	71
5.4	Stämme	71
5.4.1	<i>S. pombe</i> Stämme	71
5.4.2	<i>E. coli</i> Stämme	73
5.5	Vektoren	73
5.5.1	pRHA/pRIPHA42	73
5.5.2	pTG8	75
5.5.3	pTG13	76
5.5.4	pJK148S*	77
5.5.5	pQE31/32	78
5.5.6	pREP3	79
5.5.7	pACYC184	80
5.6	<i>S. pombe</i> Klonbank	80
5.7	Standard DNA-Methoden	82
5.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	82
5.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	82
5.7.3	Transformation von <i>S. pombe</i>	83
5.7.4	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pombe</i>	83
5.7.5	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	84
5.7.6	Dephosphorylierung von DNA	84
5.7.7	Ligation von DNA	84
5.7.8	Klenow-Polymerase Reaktion	84
5.7.9	Agarose-Gelelektrophorese	84

5.7.10	PCR – Polymerase Chain Reaction	85
5.8	Standard RNA-Methoden	86
5.8.1	Isolierung von RNA aus <i>S. pombe</i>	86
5.8.2	Auftrennung von RNA in Agarosegelen	87
5.8.3	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Blot)	87
5.8.4	Radioaktive Markierung von DNA; Sonde für den Northern-Blot	87
5.8.5	Hybridisierung von RNA	88
5.9	Standard Protein-Methoden	88
5.9.1	Isolierung von Proteinextrakten aus <i>S. pombe</i>	88
5.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford	88
5.9.3	Auftrennung von Proteinen in SDS-Gelen	89
5.9.4	Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)	89
5.9.5	Immunonachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran	89
5.10	Methoden zur Untersuchung von <i>S. pombe</i>	90
5.10.1	Tetradenanalyse	90
5.10.2	Herstellung diploider <i>S. pombe</i> Zellen	91
5.10.3	Zellzyklusarretierung mit Hilfe des <i>cdc10-129<sup>ts</sup></i> -Allels	92
5.10.4	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: Lokalisation von GFP-Prp4p und HA-Prp1p	93
5.10.5	FACS-Analyse	94
5.11	Gerichtete Mutagenese von <i>prp4</i> und <i>ubp21</i>	95
5.12	Test der Deubiquitinierungsaktivität von <i>ubp21</i>	97
5.13	Computerunterstützte Methoden	97
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	99
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	113
7.1	Sequenzen	113
7.1.1	Aminosäuresequenz von Prp4p	113
7.1.2	Aminosäuresequenz von Ubp21p	113
7.2	Genetische Karte <i>S. pombe</i>	115

## Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ars	Autonome Replikationssequenz
bp	Basenpaar
cdc	cell division cycle
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hemagglutinin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kb	Kilobase
LiAc	Lithiumacetat
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
prp	pre-mRNA processing
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

# 1 Zusammenfassung

Die Prp4p Proteinkinase von *S.pombe* ist direkt am Prä-mRNA Spleißvorgang beteiligt.

Die Suche nach Interaktionspartnern der Kinase durch Test auf synthetische Letalität ergab die genetische Interaktion von Prp4p mit den Spleißfaktoren Cdc5p, Prp5p, Prp1p und Prp10p.

Ebenfalls wurden zwei extragene Suppressoren *spp41* und *spp42* und ein High-Copy-Suppressor *ubp21* der Prp4p Kinase identifiziert.

Spp42p ist ein konservierter Spleißfaktor, der wichtige Funktionen am aktiven Zentrum des Spleißosoms erfüllt.

Hingegen ist Ubp21p ein Deubiquitinierungsenzym und gehört nicht zu der Gruppe der Spleißfaktoren.

Alle Spleißfaktoren, die mit der Prp4p Kinase genetisch interagieren, sind an unterschiedlichen Prozessen des Prä-mRNA Spleißvorgangs beteiligt.

Die Interaktion von Prp4p mit Prp1p wurde in der Arbeitsgruppe ausführlich untersucht. Es zeigte sich, daß Prp1p ein physiologisches Substrat der Prp4p Kinase ist.

Möglicherweise kontrolliert die Kinaseaktivität der Prp4p durch Phosphorylierung von Prp1p die Bildung eines aktiven Spleißosoms.

Die Kinasedomäne von Prp4p zeigt große Ähnlichkeit zu CDK`s (cyclin-dependent kinases) und MAPK`s (mitogen-activated kinases). Die Mutationsanalyse der stark konservierten Aminosäuresequenz ALKHP in der Subdomäne XI der Kinase ergab, daß die strukturellen Merkmale dieser Sequenz für die Funktion der Kinase essentiell sind.

*ubp21* wurde als High-Copy-Suppressor einer Mutation des ALKHP-Motivs isoliert. *ubp21* kodiert für ein Deubiquitinierungsenzym, das zur Ubp-Familie (ubiquitin-specific processing protease) gehört. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p das Gleichgewichtsniveau von Prp4p reguliert.



## 2 Einleitung

Die Sequenzierung von unzähligen Genomen verschiedener Organismen innerhalb der letzten Jahre hat die Datenmenge von Proteinen in den Datenbanken zu einer kaum noch überschaubaren Größe anwachsen lassen. Jedoch die Kenntnis eines offenen Leserasters (ORF) gibt keinen Hinweis auf die Funktion des kodierten Proteins. Die Grundlagenforschung benötigt daher geeignete Modellorganismen, wie zum Beispiel die eukaryotische Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*, um auch *in vivo* die Funktion und Wirkungsweise eines Gens bestimmen zu können. Hierbei ist die leichte genetische Manipulation des Organismus eine wichtige Voraussetzung.

In diesem Zusammenhang ist die klassische Hefegenetik eine essentielle Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die eine eukaryotische Zelle ausmachen. So kann eine genetische Interaktion von Genen auf eine physiologische Interaktion der Partner hindeuten (Forsburg, 2001). Der Test auf synthetische Letalität zweier konditional letaler Mutanten wird genutzt, um Interaktionen von Proteinen nachzuweisen. Der Nachweis einer Interaktion beruht dabei auf dem letalen Phänotyp der Doppelmutante unter permissiven Bedingungen. Die Einzelmутanten zeigen unter gleichen Bedingungen keinen Phänotyp (Forsburg, 2001; Guarente, 1993).

Häufig werden für diese Untersuchungen temperatursensitive Mutanten der Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, die einen Defekt in einem spezifischen Prozess nur bei restriktiver Temperatur zeigen. So konnten mittlerweile einige Mutanten aus beiden Hefen isoliert werden, die unter restriktiven Bedingungen unter anderem einen Defekt im Prä-mRNA Spleißvorgang aufweisen (Rosenberg *et al.*, 1991; Urushiyama *et al.*, 1996; Potashkin *et al.*, 1998; Vijayraghavan *et al.*, 1989; Ruby, & Abelson, 1991). Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Mutanten ermöglichte Untersuchungen des komplexen Mechanismus des Spleißvorgangs.

Die meisten Protein-kodierenden Gene in Eukaryoten werden von nicht-kodierenden Sequenzen, den Introns, unterbrochen. Die Gewährleistung einer korrekten Proteinexpression bedingt das Entfernen dieser Introns. Der Vorgang, bei dem die

Introns aus der Prä-mRNA entfernt werden und die kodierenden Sequenzen, die Exons, zu einer fertigen mRNA verbunden werden, wird als Prä-mRNA Spleißen bezeichnet.

Der Spleißvorgang wird in Eukaryoten von einem großen Ribonukleoprotein-komplex im Zellkern der Zelle durchgeführt. Der Komplex, der als Spleißosom bezeichnet wird, besteht aus mehr als 80 verschiedenen Proteinen und fünf kleinen RNA-Molekülen, die als snRNAs (small nuclear RNAs) bezeichnet werden (Burge *et al.*, 1999). Die snRNAs lagern sich mit verschiedenen Proteinen zu vier Hauptkomponenten des Spleißosoms zusammen, den sogenannten snRNPs (small ribonukleoprotein particles) (Lamm, & Lamond, 1993). U1, U2, U5 und U4/U6 snRNP werden nach ihren Uridin-reichen snRNA Komponenten benannt. Die U4/U6 snRNAs liegen immer basengepaart vor (Madhani, & Guthrie, 1994).

Das Spleißosom zeichnet sich durch seine hoch dynamische Struktur aus. Durch Auflösung von RNA-RNA-, und Protein-RNA-Interaktionen und dem Eingehen neuer Interaktionen wird das spezifische Entfernen der Intronsequenzen aus der Prä-mRNA möglich. Die Erkennung des Introns durch den Spleißosomkomplex ist eine entscheidene Voraussetzung für das erfolgreiche Spleißen. Es konnten nur drei kurze, konservierte Sequenzen identifiziert werden, die ein Intron kennzeichnen (Burge *et al.*, 1999). Diese Sequenzen befinden sich zum Einen an den Grenzen des Introns zum Exon und werden als 5`-, und 3`-Spleißstelle bezeichnet. In Eukaryoten sind jeweils die ersten und die letzten beiden Nukleotide der 5`-Spleißstelle (**GTRAGU**) und der 3`-Spleißstelle (**YAG**) konserviert. Zum Anderen befindet sich an der Intronverzweigungsstelle (Branchpoint) ein konserviertes Adenosin-Nukleotid, dessen umgebende Konsensussequenz in *S. cerevisiae* stark konserviert (**UACUAAC**), hingegen in *S. pombe* degeneriert ist (**CURAY**). Auch in Säugerzellen ist nur eine degenerierte Branchpoint Konsensussequenz zu finden.

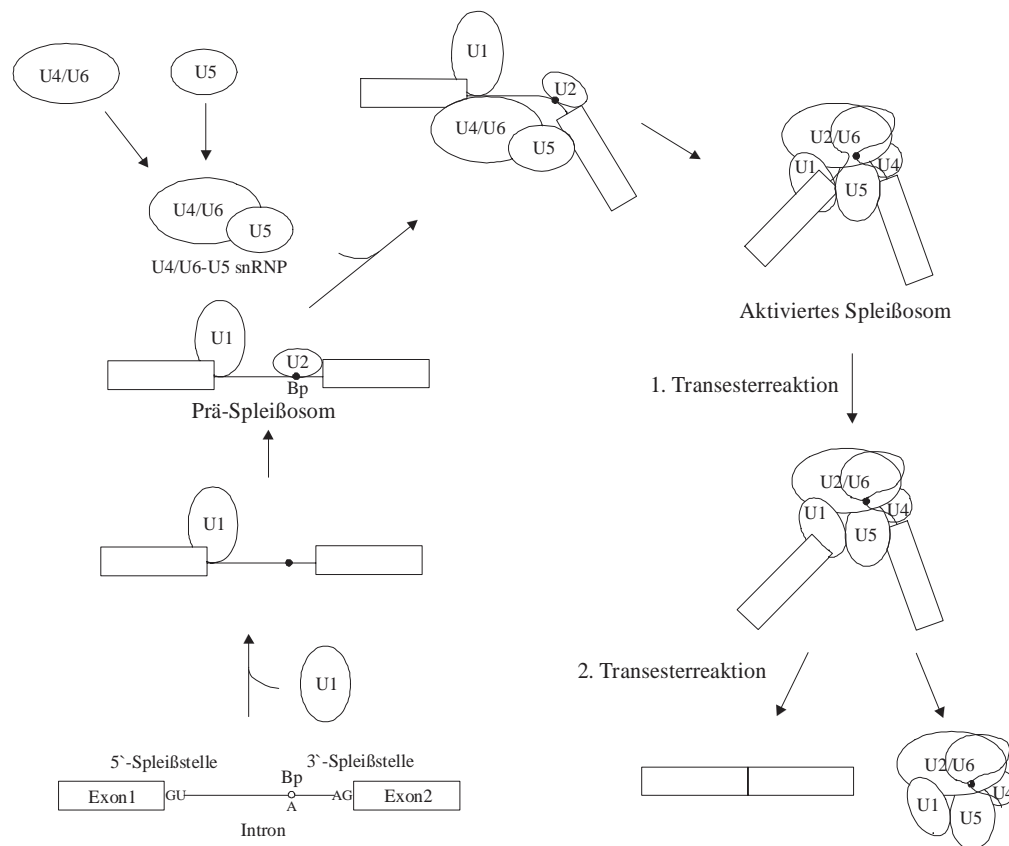
*In vitro* Analysen zum Spleißosomaufbau ergaben, daß durch die schrittweise Anlagerung der snRNPs an das Intron der Spleißosomkomplex aufgebaut wird. Die Erkennung der konservierten Sequenzen erfolgt durch die snRNPs. Dabei bindet zuerst U1 snRNP durch Basenpaarung der snRNA an die 5`-Spleißstelle (Abb. 2.1). Anschließend geht die U2 snRNA eine Basenpaarung mit der Branchpoint-Region ein. Beide snRNPs und die Prä-mRNA bilden das Prä-Spleißosom (Abb. 2.1). Zuletzt

bindet ein zuvor gebildeter U4/U6•U5 snRNP Komplex und leitet die Spleißreaktion ein (Abb. 2.1).

Eine Reihe von Konformationsänderungen führt zur Bildung eines aktiven Spleißosoms. Die Basenpaarung zwischen der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle und die Basenpaarung zwischen der U4 snRNA und U6 snRNA werden aufgehoben. Zwischen der U2 und der U6 snRNA wird mit der Branchpoint-Sequenz und der 5'-Spleißstelle eine neue Paarung gebildet (Wu, & Manley, 1991; Madhani, & Guthrie, 1994; Nilsen *et al.*, 1994).

Nach der Aktivierung des Spleißosoms kommt es nun zur Spleißreaktion. Zwei nacheinander erfolgende Transesterreaktionen führen zur Freisetzung des Introns und zur anschließenden Verknüpfung der Exons (Abb. 2.1) (Sharp, 1994). Möglicherweise wird bei diesen Reaktionen das aktive Zentrum des Spleißosoms von der U2/U6 snRNA gebildet (Sun, & Manley, 1995; Umen, & Guthrie, 1995). Der Mechanismus der Reaktionen ist dem Mechanismus des Selbstspleißens von Gruppe II Introns sehr ähnlich, so daß die Vermutung nahe liegt, daß RNA-Komponenten für die Spleißreaktionen verantwortlich sind. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß *in vitro* synthetisierte U2 und U6 RNA einen Komplex ausbilden. Wird zu diesem Komplex ein RNA-Oligonukleotid, das die Sequenz einer Branchpoint-Region enthält, gegeben, so bindet der Komplex an die RNA und katalysiert eine Reaktion, die mit der 1. Transesterreaktion des Spleißosoms vergleichbar ist (Valadkhan, & Manley, 2001).

Den spleißosomalen RNA-Komponenten kommt also die Erkennung der Introns zu und sie bilden scheinbar auch das aktive Zentrum des Spleißosoms. Nun stellt sich die Frage nach der Aufgabe der über 100 Proteine, die am Spleißvorgang beteiligt sind (Burge *et al.*, 1999).



**Abb. 2.1** Schematische Darstellung der schrittweisen Anlagerung der snRNP Partikel an die Prä-mRNA und die anschließenden Transesterreaktionen. Der Aufbau des Spleißosoms wird mit der Bindung des U1 snRNPs an die Prä-mRNA eingeleitet. Die Bindung des U2 snRNPs an die Intronverzweigungsstelle (Bp, Branchpoint) führt zur Bildung des Prä-Spleißosoms. Zuletzt bindet der U4/U6•U5 snRNP-Komplex. Konformationsänderungen führen zur Bildung eines aktiven Spleißosoms, das die Transesterreaktionen durchführt. Dabei kommt es zur Spaltung der Phosphodiesterbindung an der 5`-Spleißstelle und zur Verknüpfung des 5`-Endes des Introns mit dem konservierten Adenosin-Nukleotid in der Branchpoint-Sequenz. Anschließend werden in einer 2. Transesterreaktion die Exons miteinander verknüpft und das Intron in Form einer Lassostruktur freigesetzt. Außer der snRNPs sind weitere andere nicht-snRNP Faktoren für den Spleißvorgang notwendig, die hier zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt wurden. U1, U2, U4/U6, U5 Bezeichnung der entsprechenden snRNPs; GU – AG, Konservierte Bereiche des Introns in Eukaryonten; A, konserviertes Adenosin-Nukleotid in der Branchpoint-Sequenz.

Zur Klärung dieser Frage, ist es notwendig zu untersuchen, ob und welche Protein-Protein-, und Protein-RNA-Interaktionen während des Spleißprozesses eingegangen werden. Der auf Seite 11 (Kap. 3.1) beschriebene Test auf synthetische Letalität ist eine genetische Methode, um Interaktionen festzustellen. Eine weitere klassische Methode zur Identifizierung von Interaktionen ist die Suche nach Suppressoren. Der Suppressor unterdrückt einen letalen Phänotyp im Vergleich zur synthetischen Letalität, bei der ein letaler Phänotyp verursacht wird (Forsburg, 2001). Beide Methoden sollen in dieser Arbeit angewandt werden, um Interaktionen zu identifizieren.

### **1.1 Ziel dieser Arbeit**

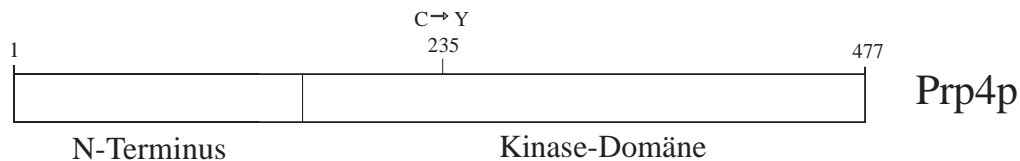
Die Prp4p Proteinkinase aus *S. pombe* ist ein Protein, das am Prä-mRNA Spleißvorgang direkt beteiligt ist. Ihr Wirkungsort und mögliche Interaktionspartner sind bisher jedoch nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifizierung von Prp4p-Interaktionspartnern in *S. pombe*, um damit die spezifische Funktion der Prp4p Kinase innerhalb des Spleißprozesses aufzuklären.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genetische Interaktionspartner der Prp4p Proteinkinase

Die Prp4p Kinase ist die erste bekannte Proteinkinase, die am Prä-mRNA-Spleißvorgang beteiligt ist. Die Aktivität der Prp4p Kinase ist essentiell für den Spleißprozeß in *S. pombe* (Schwelnus *et al.*, 2001). Das *prp4* Gen wurde durch Komplementierung des temperatursensitiven Allels *prp4-73<sup>ts</sup>* aus einer genomischen *S. pombe* Genbank isoliert (Alahari *et al.*, 1993). Es liegt auf Chromosom III des Hefegenoms und kodiert für ein Protein von 477 Aminosäuren. Das *prp4-73<sup>ts</sup>*- Allel trägt eine Punktmutation in der Kinasedomäne, die zum Einbau eines Tyrosin statt eines Cystein an Position 235 im Protein führt (Abb. 3.1). Die Zellen des *prp4-73<sup>ts</sup>* Stammes stellen ihr Wachstum bei der restriktiven Temperatur (36 °C) ein. Mit dem Wachstumsstop der Zellen geht die Akkumulierung von Prä-mRNA intronhaltiger Gene einher (Rosenberg *et al.*, 1991). Bei der permissiven Temperatur (25 °C) unterscheiden sich die Zellen morphologisch nicht von Wildtypzellen und spleißen effizient Prä-mRNA.



**Abb. 3.1** Schematische Darstellung des Prp4-Proteins. C-terminal ist die Kinase-Domäne angedeutet. Oberhalb des Schemas ist die Aminosäure der Wildtypsequenz (C, Cystein) und die in der *prp4-73<sup>ts</sup>*-Mutante vorhandene Aminosäure (Y, Tyrosin) an Position 235 in der Kinase-Domäne angegeben (Schwelnus *et al.*, 2001).

Auf Grund der Akkumulierung von Prä-mRNA bei restriktiver Temperatur wurden mittlerweile in *S. pombe* 14 verschiedene *prp<sup>ts</sup>*-Mutanten identifiziert, die am Spleißprozeß beteiligt sind (Rosenberg *et al.*, 1991; Urushiyama *et al.*, 1996;

Potashkin *et al.*, 1998). Die Abkürzung *prp* steht dabei für pre-mRNA-processing. Alle temperatursensitiven *prp*-Mutanten stellen ihr Wachstum bei der restriktiven Temperatur ein und reichern Prä-mRNA an. Bei der permissiven Temperatur verhalten sie sich wie Wildtyp-Zellen.

Einige der *prp<sup>ts</sup>* Allele wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Tokio Tani bereits auf genetische Interaktion mit einem *prp4<sup>ts</sup>* Allel getestet. Hierzu wurde ein Stamm, der das *prp4-2<sup>ts</sup>* Allel trägt, mit unterschiedlichen Stämmen, die verschiedene *prp<sup>ts</sup>* Allele tragen, gekreuzt und das Wachstumsverhalten der Zellen, die das *prp4-2<sup>ts</sup>* und das andere *prp<sup>ts</sup>* Allel im selben genetischen Hintergrund tragen, bei der permissiven Temperatur von 25 °C untersucht (synthetische Letalität Seite 11). Es wurden die Allele *prp1-4<sup>ts</sup>*, *prp2-2<sup>ts</sup>*, *prp3-3<sup>ts</sup>*, *prp6-1<sup>ts</sup>* und das Allel *prp13-1<sup>ts</sup>* getestet. Dabei zeigte sich, daß das *prp1-4<sup>ts</sup>* mit *prp4-2<sup>ts</sup>* interagiert. Die Allele *prp2-2<sup>ts</sup>*, *prp3-3<sup>ts</sup>*, *prp6-1<sup>ts</sup>* und *prp13-1<sup>ts</sup>* interagieren nicht mit *prp4-2<sup>ts</sup>* (Urushiyama *et al.*, 1997).

Außerdem wurde durch die Arbeitsgruppe Tokio Tani nachgewiesen, daß das Allel *prp4-2<sup>ts</sup>* und auch die Allele *prp3-2<sup>ts</sup>* und *prp11-1<sup>ts</sup>* mit dem unterbrochenen *RNPS1* bei der permissiven Temperatur synthetisch letal sind (Tani, T., persönliche Mitteilung) (Diskussion Kap. 4.1). RNPS1p (RNA-binding-protein with serine-rich domain) ist ein genereller Prä-mRNA-Spleißaktivator, der scheinbar den Prozeß des Prä-mRNA Spleißvorgangs mit dem mRNA-Export und/oder mit dem Kontrollmechanismus des „nonsense-mediated decay“ verbindet (Mayeda *et al.*, 1999; Le Hir *et al.*, 2000; Le Hir *et al.*, 2001).

Neben den *prp<sup>ts</sup>*-Mutanten wurden weitere temperatursensitive Mutanten in *S. pombe* und *S. cerevisiae* identifiziert, die einen Defekt im Prä-mRNA Spleißprozeß aufweisen. Hierbei handelt es sich um *cdc<sup>ts</sup>*-Mutanten (cell division cycle), die ursprünglich als Zellzyklusmutanten identifiziert wurden. Einige der *cdc<sup>ts</sup>*-Stämme akkumulieren wie die *prp<sup>ts</sup>*-Mutanten bei der restriktiven Temperatur Prä-mRNA (Lundgren *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 1999; Ben-Yehuda, 2000).

Da der Wirkungsort der Prp4p Kinase im Spleißprozeß bisher nicht bekannt war und auch keine Interaktionspartner identifiziert waren, wurde nach Partnern gesucht, die mit der Kinase interagieren. Hierzu wurde ein Stamm, der das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel trägt mit verschiedenen *prp<sup>ts</sup>*-Mutanten bzw. *cdc<sup>ts</sup>*-Mutanten gekreuzt und in einer

Tetradenanalyse das Wachstumsverhalten der vier Sporen bei der permissiven Temperatur untersucht.

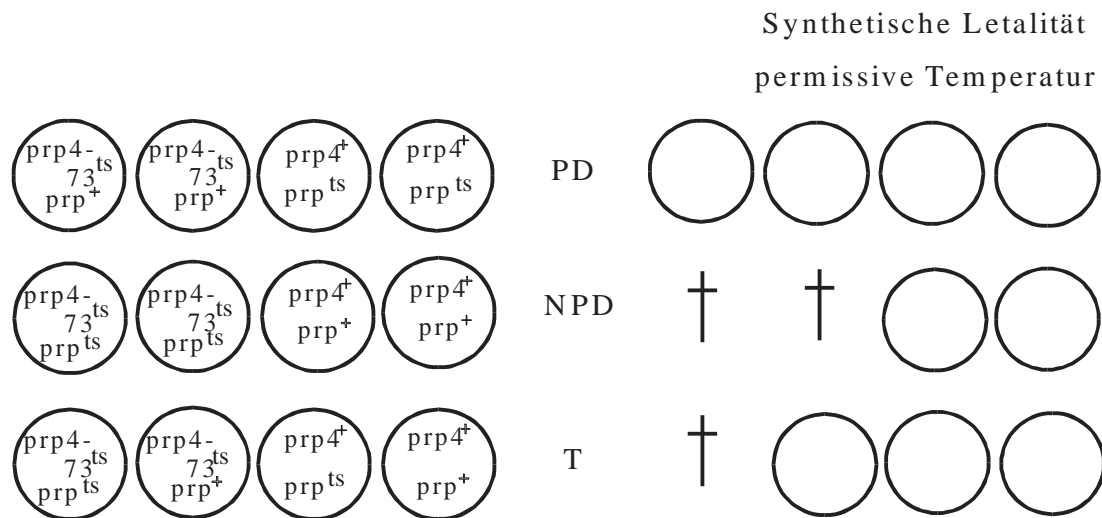
Wenn zwei *ts*-Mutanten im selben genetischen Hintergrund keine Kolonien ausbilden können, wird dies als synthetische Letalität bezeichnet. Die synthetische Letalität von *ts*-Mutanten bedingt keine direkte Interaktion der Proteine, die von diesen Genen kodiert werden, aber sie zeigt an, daß beide Proteine am gleichen Prozeß beteiligt sind (Forsburg, 2001).

Die Kreuzung des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes mit einem der *prp<sup>ts</sup>*-Stämme führt zur Fusion der Hefezellen und nach anschließender Meiose zur Bildung eines zygotischen Askus mit vier haploiden Sporen (Gutz *et al.*, 1974). Diese Sporen unterscheiden sich in ihrem Genotyp, der durch die Rekombinationsereignisse während der Meiose bestimmt wird. Es kann zwischen drei Tetradentypen unterschieden werden (Abb. 3.2). Der Parentale Dityp (PD) entspricht den Genotypen der Elternstämme. Jeweils zwei Sporen tragen das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel und das Wildtyp-Allel des jeweiligen anderen *prp*-Gens. Die anderen beiden Sporen tragen das *prp<sup>ts</sup>*-Allel und das *prp4<sup>+</sup>*-Allel. Die Tetrade eines Nichtparentalen Dityps (NPD) enthält vier Sporen mit neukombinierten Allelen. Zwei Sporen enthalten die Wildtypallele von *prp4* und des anderen *prp*-Gens und zwei Sporen enthalten die temperatursensitiven Allele von *prp4* und des anderen *prp*-Gens. Der Tetratyp (T) beinhaltet alle vier Kombinationen der betrachteten Allele. Eine Spore entspricht genotypisch dem *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm, eine Spore entspricht genotypisch dem *ts*-Stamm des anderen Kreuzungspartners, die dritte Spore enthält die Wildtyp-Allele der beiden Loci und die vierte Spore enthält das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel und das *prp<sup>ts</sup>*-Allel des anderen Kreuzungspartners.

Interagieren zwei *ts*-Allele, so sind die Sporen der Doppelmutante letal. Eine Tetrade eines Parentalen Dityps wächst mit allen vier Sporen zu Kolonien heran. Der Nichtparentale Dityp enthält zwei wachsende und zwei nicht wachsende Sporen. Der Tetratyp wächst mit drei Sporen aus. Eine Spore ist letal (Abb. 3.2).

Sind die untersuchten *ts*-Allele nicht gekoppelt, treten die drei Klassen der Tetradentypen im Verhältnis Parentaler Dityp, Nichtparentaler Dityp zu Tetratyp mit 1 : 1 : 4 auf.

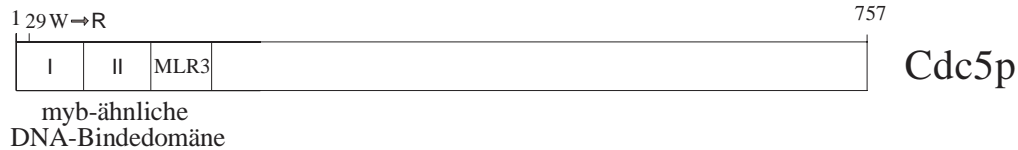




**Abb. 3.2** Schematische Darstellung der Genotypen von den drei Tetradenklassen. Ein Kreis deutet jeweils eine Spore an. Die temperatursensitiven Allele sind mit ts bezeichnet und die Wildtypallele mit + (Allelnamen sind zu Gunsten der besseren Lesbarkeit hier nicht kursiv geschrieben). PD, Parentaler Dityp; NPD, Nichtparentaler Dityp; T, Tetratyp. Die rechte Seite der Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten der Sporen bei permissiver Temperatur, wenn die ts-Allele der Gene im selben genetischen Hintergrund synthetisch letal sind. †, kein Wachstum der Spore.

Die Tetradenanalyse von gekoppelten Genen ergibt einen höheren Anteil an Parentalen Ditypen gegenüber Nichtparentalen Ditypen. Die Trennung der Gene durch Rekombinationsereignisse erfolgt seltener und wird durch den Abstand der beiden Loci bestimmt. Die Klasse der Nichtparentale Ditypen tritt nur auf, wenn zwischen den Genen mindestens zwei Crossing-over erfolgen. Je geringer der Abstand zweier Gene ist, um so weniger Crossing-over erfolgen zwischen den Loci. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Parentalen Dityps ist erhöht, da bei dieser Klasse von Tetradentypen die Gene nicht durch Rekombination voneinander getrennt werden müssen.

### 3.1.1 *cdc5-120<sup>ts</sup>* interagiert genetisch mit *prp4-73<sup>ts</sup>*

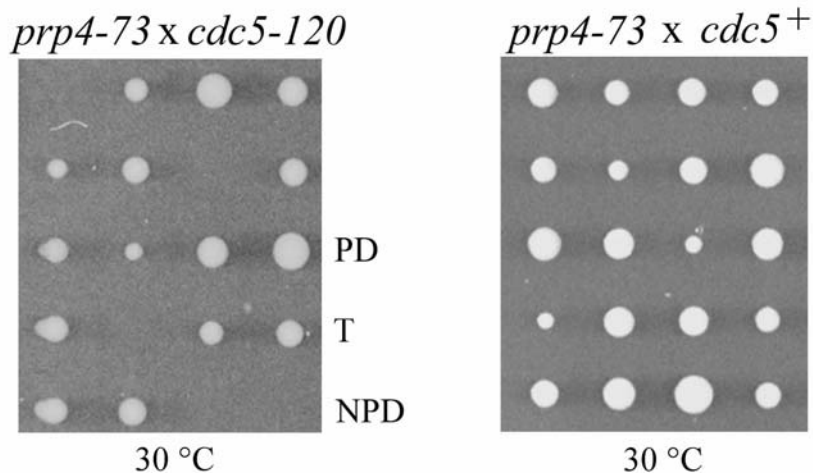


**Abb. 3.3** Schematische Darstellung des Cdc5-Proteins. Durch Kästchen ist die myb-ähnliche DNA-Bindedomäne dargestellt, die in zwei konservierte Myb I-, und Myb II-Motive und in ein weniger stark konserviertes Myb-Motiv MLR3 (Myb-like repeat) unterteilt ist. Oberhalb des Schemas ist die Aminosäure der Wildtypsequenz (W, Tryptophan) und die in der *cdc5-120<sup>ts</sup>*-Mutante vorhandene Aminosäure (R, Arginin) an Position 29 im Motiv I angegeben (Ohi *et al.*, 1998).

Das *cdc5* Gen ist essentiell für das Wachstum von *S. pombe*. Es liegt auf Chromosom I des Genoms und kodiert für ein Protein von 757 Aminosäuren. Am C-Terminus befindet sich eine myb-ähnliche DNA-Bindungsdomäne, die im Vergleich zu Myb-Proteinen anderer Organismen stark konservierte Aminosäuren enthält (Ohi *et al.*, 1994). Das *cdc5-120<sup>ts</sup>*-Allel trägt eine Punktmutation im Myb-Motiv I (Abb. 3.3) (Bottner, 2001). Dies führt zum Austausch eines Tryptophans gegen ein Arginin im Protein. Die Zellen des *cdc5-120<sup>ts</sup>* Stammes stellen bei der restriktiven Temperatur das Wachstum ein. Die Einstellung des Wachstums geht einher mit der Akkumulierung von Prä-mRNA (McDonald *et al.*, 1999). Dieser schon für die *prp<sup>ts</sup>*-Gene beschriebene Phänotyp weist darauf hin, daß das Cdc5p am Spleißprozess beteiligt ist. Der *cdc5-120*-Stamm wurde ursprünglich als temperatursensitive Zellzyklusmutante identifiziert, deshalb wurde es mit *cdc* (cell division cycle) bezeichnet (Nurse *et al.*, 1976; Nasmyth, & Nurse, 1981). Die Zellen des *cdc5-120*-Stammes arretieren bei der restriktiven Temperatur in der G2-Phase des Zellzyklus (Ohi *et al.*, 1994).

Diese Beobachtungen weisen daraufhin, daß möglicherweise ein Zusammenhang zwischen den komplexen Vorgängen des Zellzyklus und des Prä-mRNA-Spleißvorgangs besteht (Diskussion Kap. 4.1).

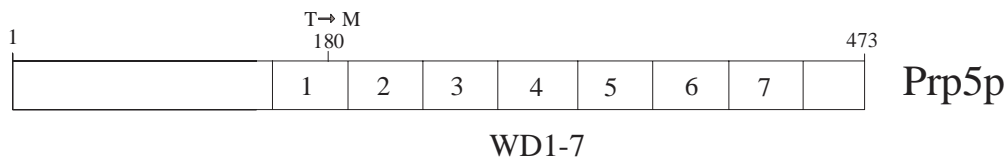
Die Tetradenanalyse der Kreuzung von *prp4-73<sup>ts</sup>* und *cdc5-120<sup>ts</sup>* ergab bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C eine Aufspaltung von 7 PD, 2 NPD und 9 T (eine Auswahl der Tetraden in Abb. 3.4). Die Sporen der Doppelmutante waren nicht in der Lage Kolonien bei der permissiven Temperatur zu bilden. Die Anzahl der unterschiedlichen Tetradentypen entspricht dem erwarteten Verhältnis für ungekoppelte Gene. Dieses Ergebnis zeigt, daß *prp4-73<sup>ts</sup>* und *cdc5-120<sup>ts</sup>* im gleichen genetischen Hintergrund synthetisch letal sind.



**Abb. 3.4** Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *cdc5-120<sup>ts</sup>* bei 30 °C (links). Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *cdc5<sup>+</sup>* bei 30 °C (rechts). PD, Parentaler Dityp mit vier wachsenden Kolonien; NPD, Nichtparentaler Dityp mit zwei wachsenden Kolonien; T, Tetratyp mit drei wachsenden Kolonien.

### 3.1.2 *prp5-1<sup>ts</sup>* interagiert genetisch mit *prp4-73<sup>ts</sup>*

Das *prp5* Gen ist essentiell für das Wachstum von *S. pombe*. Es liegt auf Chromosom II und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 473 Aminosäuren. Am C-Terminus befinden sich sieben konservierte WD-Domänen (Käufer, & Potashkin, 2000). Diese Domänen bilden eine propellerartige Struktur, die zur Interaktion mit anderen Proteinen dient (Garcia-Higuera *et al.*, 1998). Das *prp5-1<sup>ts</sup>* Allel trägt eine Punktmutation im WD-Motiv 1 (Abb. 3.5) (Opitz, 2001).

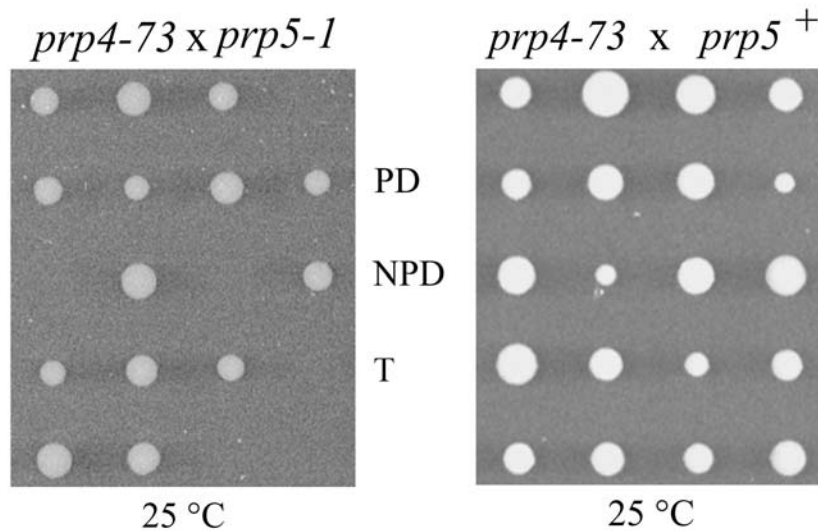


**Abb. 3.5** Schematische Darstellung des Prp5-Proteins. Die WD-Domänen sind mit 1 bis sieben nummeriert und als Kästchen dargestellt. Über dem Schema ist die Aminosäure der Wildtypsequenz (T, Threonin) und die in der *prp5-1<sup>ts</sup>*-Mutante vorhandenen Aminosäure (M, Methionin) an Position 180 im WD1-Motiv angegeben (Potashkin *et al.*, 1998; Käufer, & Potashkin, 2000; Opitz, 2001).

Die Mutation in der Basensequenz des offenen Leserasters führt im Protein zum Einbau eines Methionins statt eines Threonins (Opitz, 2001). Das *prp5-1<sup>ts</sup>* Allel ist zum Einen durch die Akkumulierung von Prä-mRNA bei der restriktiven Temperatur charakterisiert (Potashkin *et al.*, 1998). Zum Anderen ergaben weitere Untersuchungen der Mutante auch einen Zellzyklusdefekt. Die Zellen verlängern sich über ihre normale Größe hinaus bei der restriktiven Temperatur und arretierten in der G2-Phase des Zellzyklus vor dem Übergang zur Mitose (Potashkin *et al.*, 1998). Auch Prp5p scheint am Spleißprozess und im Zellzyklus beteiligt zu sein.

Diese Beobachtungen weisen ebenfalls daraufhin, daß möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und Prä-mRNA-Spleißvorgang besteht (Diskussion Kap. 4.1).

Die Tetradenanalyse der Kreuzung von *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp5-1<sup>ts</sup>* ergab eine Aufspaltung von 19 PD, 11 NPD und 15 T ( eine Auswahl der Tetraden in Abb. 3.6). Die Sporen der Doppelmutanten waren letal, so daß daraus geschlossen werden kann, das *prp4-73<sup>ts</sup>* und *prp5-1<sup>ts</sup>* bei 25 °C synthetisch letal sind.



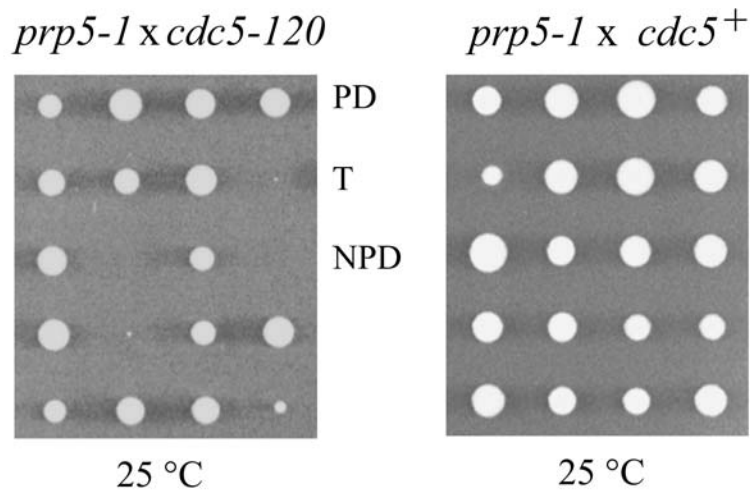
**Abb. 3.6** Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp5-1<sup>ts</sup>* bei 25 °C (links). Rechts Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp5<sup>+</sup>* bei 25 °C. PD, Parentaler Dityp mit vier wachsenden Kolonien; NPD, Nichtparentaler Dityp mit zwei wachsenden Kolonien; T, Tetratyp mit drei wachsenden Kolonien.

### 3.1.3 *prp5-1<sup>ts</sup>* interagiert genetisch mit *cdc5-120<sup>ts</sup>*

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigten, daß *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp5-1<sup>ts</sup>* sowie auch mit *cdc5-120<sup>ts</sup>* synthetisch letal ist. Nun sollte untersucht werden, ob auch *prp5-1<sup>ts</sup>* und *cdc5-120<sup>ts</sup>* bei der permissiven Temperatur synthetisch letal sind.

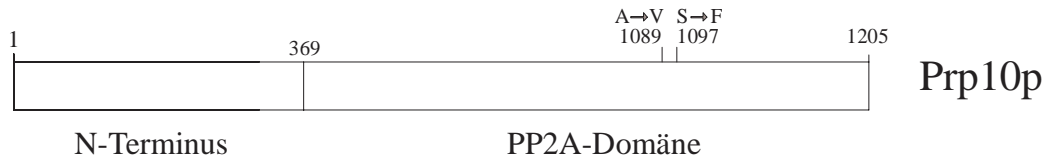
Die Tetradenanalyse der Kreuzung *prp5-1<sup>ts</sup>* mit *cdc5-120<sup>ts</sup>* zeigt, daß beide Allele im selben genetischen Hintergrund bei 25 °C synthetisch letal sind. Es wurden alle drei Klassen der Tetradentypen identifiziert. Die Anzahl von PD, NPD und T (8, 21 und 30) entsprach dem erwarteten Verhältnis für ungekoppelte Gene ( eine Auswahl der Tetraden in Abb. 3.7).

Daraus ist zu schließen, daß nicht nur *prp4-73<sup>ts</sup>* mit seinen Partnern interagiert, sondern auch die Interaktionspartner *prp5-1<sup>ts</sup>* und *cdc5-120<sup>ts</sup>* miteinander interagieren.



**Abb. 3.7** Tetradenanalyse der Kreuzung *prp5-1<sup>ts</sup>* mit *cdc5-120<sup>ts</sup>* bei 25 °C (links). Rechts Tetradenanalyse der Kreuzung *prp5-1<sup>ts</sup>* mit *cdc5*<sup>+</sup> bei 25 °C. PD, Parentaler Dityp mit vier wachsenden Kolonien; NPD, Nichtparentaler Dityp mit zwei wachsenden Kolonien; T, Tetratyp mit drei wachsenden Kolonien.

### 3.1.4 *prp10-1<sup>ts</sup>* interagiert genetisch mit *prp4-73<sup>ts</sup>*

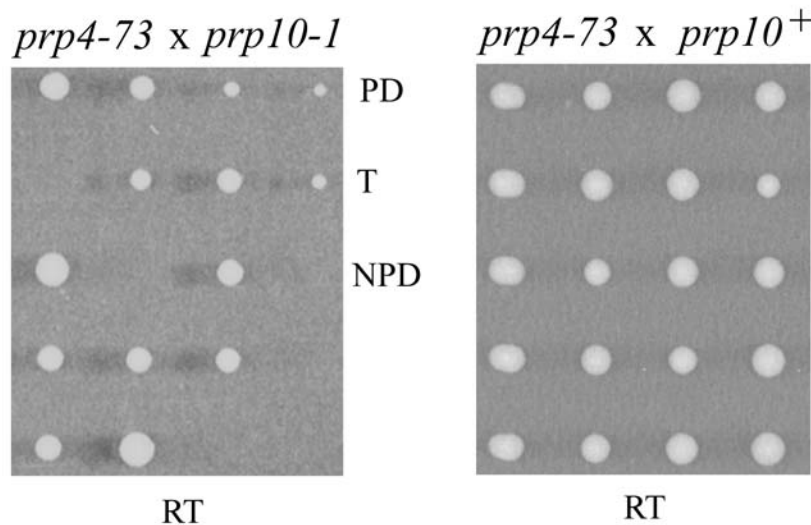


**Abb. 3.8** Schematische Darstellung des Prp10-Proteins. C-terminal ist die PP2A-Domäne angedeutet. Oberhalb des Schemas sind die Aminosäuren der Wildtypsequenz (A, Alanin; S, Serin) und die in der Mutante *prp10-1* vorhandenen Aminosäuren (V, Valin; F, Phenylalanin) an Position 1089 und 1097 angegeben (Habara *et al.*, 1998).

Das *prp10* Gen ist essentiell für das Wachstum von *S. pombe*. Es liegt auf Chromosom II und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1205 Aminosäuren.

Zwei Drittel des Prp10p sind hochkonserviert und enthalten Konsensuswiederholungen der regulatorischen Untereinheit A von Proteinphosphatase PP2A (Habara *et al.*, 1998). Das *prp10-1<sup>ts</sup>*-Allel trägt zwei Punktmutationen in der Basensequenz des offenen Leserasters. Diese Mutationen führen im Protein zum Einbau eines Valins und eines Phenylalanins statt eines Alanins und eines Serins (Abb. 3.8).

Die Tetradenanalyse der Kreuzung von *prp4-73<sup>ts</sup>* und *prp10-1<sup>ts</sup>* ergab eine Aufspaltung in die drei Klassen der Tetradentypen (eine Auswahl der Tetraden in Abb. 3.9; Material und Methoden Kap. 5.10.1). *prp4-73<sup>ts</sup>* und *prp10-1<sup>ts</sup>* sind bei Raumtemperatur synthetisch letal.

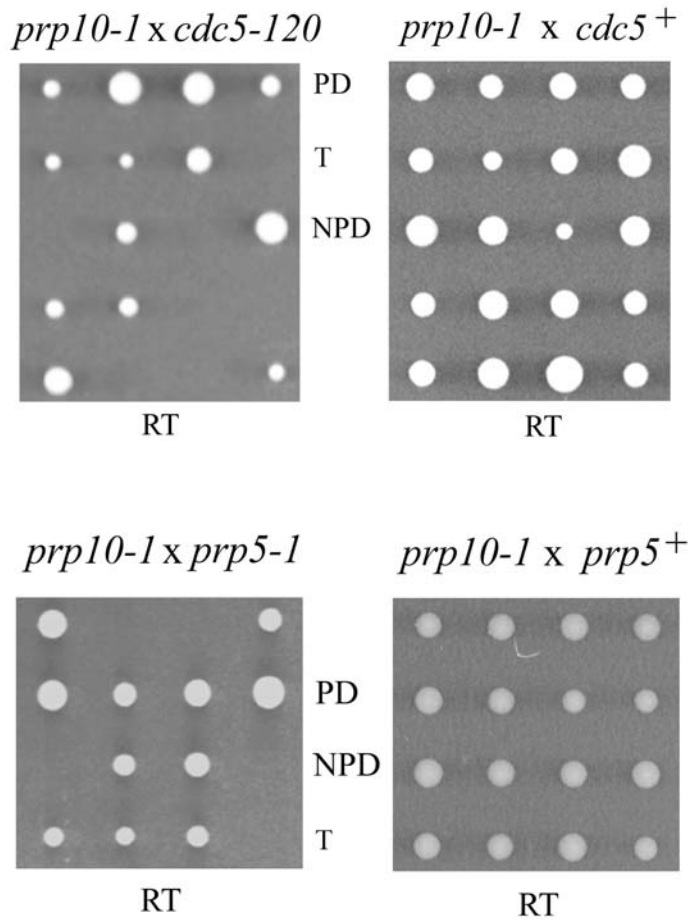


**Abb. 3.9** Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp10-1<sup>ts</sup>* bei Raumtemperatur (RT). Rechts Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp10<sup>+</sup>* bei Raumtemperatur (Abkürzungen wie in Abb. 3.7)

### 3.1.5 *prp10-1<sup>ts</sup>* interagiert genetisch mit *prp5-1<sup>ts</sup>* und auch mit *cdc5-120<sup>ts</sup>*

Die Tetradenanalyse der Kreuzungen von *prp10-1<sup>ts</sup>* mit *prp5-1<sup>ts</sup>* ebenso mit *cdc5-120<sup>ts</sup>* zeigt genetische Interaktion der Allele. Bei der Analyse konnten alle drei Klassen der Tetradentypen identifiziert werden. Die Sporen der Doppelmutanten sind

in beiden Analysen bei Raumtemperatur letal (eine Auswahl der Tetraden in Abb. 3.10; Material und Methoden Kap. 5.10.1). *prp10-1<sup>ts</sup>* und *prp5-1<sup>ts</sup>* sowie *prp10-1<sup>ts</sup>* und *cdc5-120<sup>ts</sup>* sind im selben genetischen Hintergrund synthetisch letal. Alle betrachteten ts-Allele interagieren untereinander und ebenfalls mit *prp4-73<sup>ts</sup>*.



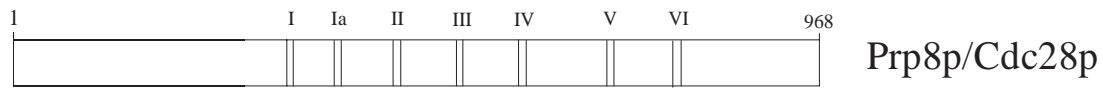
**Abb. 3.10** Tetradenanalyse der Kreuzungen von *prp10-1<sup>ts</sup>* mit *prp5-1<sup>ts</sup>* bzw. *cdc5-120<sup>ts</sup>* bei Raumtemperatur (links). Rechts Tetradenanalyse der Kreuzungen von *prp10-1<sup>ts</sup>* mit *prp5<sup>+</sup>* bzw. *cdc5<sup>+</sup>* bei Raumtemperatur.

### 3.1.6 *prp8/cdc28-P8<sup>ts</sup>* interagiert nicht mit *prp4-73<sup>ts</sup>*

*cdc28* ist essentiell für das Wachstum von *S. pombe*. Das Gen liegt auf Chromosom II des Genoms. Es kodiert für eine RNA-abhängige ATPase mit einer Größe von 968



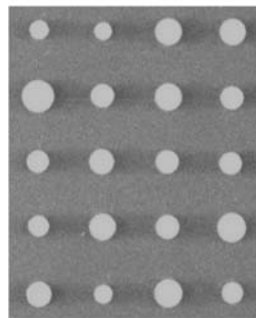
Aminosäuren und gehört zur RNA-Helikase Familie mit DEAH-Box-Motiv (Abb. 3.11) (Imamura *et al.*, 1998).



**Abb. 3.11** Schematische Darstellung des Prp8/Cdc28-Proteins. Mit Strichen ist die Lage der Motive I bis VI angegeben, die für DEAH-Box RNA Helikasen charakteristisch sind. Motiv II enthält die DEAH-Aminosäuresequenz. Die Mutationsstelle ist nicht bekannt (Imamura *et al.*, 1998).

*cdc28-P8<sup>ts</sup>* wurde als Mutante isoliert, die bei der restriktiven Temperatur nicht in der Lage ist, den Zellzyklus zu durchlaufen. Die Zellen des *cdc28-P8<sup>ts</sup>* Allels arretieren am Übergang von der G2-Phase in die Mitose (Nasmyth, & Nurse, 1981). Die temperatursensitive Mutante akkumuliert bei der restriktiven Temperatur Prä-mRNA von intronhaltigen Genen und wurde deshalb in einem unabhängigen Screen als *prp8* bezeichnet (Urushiyama *et al.*, 1996). Es zeigte sich später, daß *cdc28* und *prp8* allelisch sind (Lundgren *et al.*, 1996).

*prp4-73* x *prp8/cdc28-P8*



25 °C

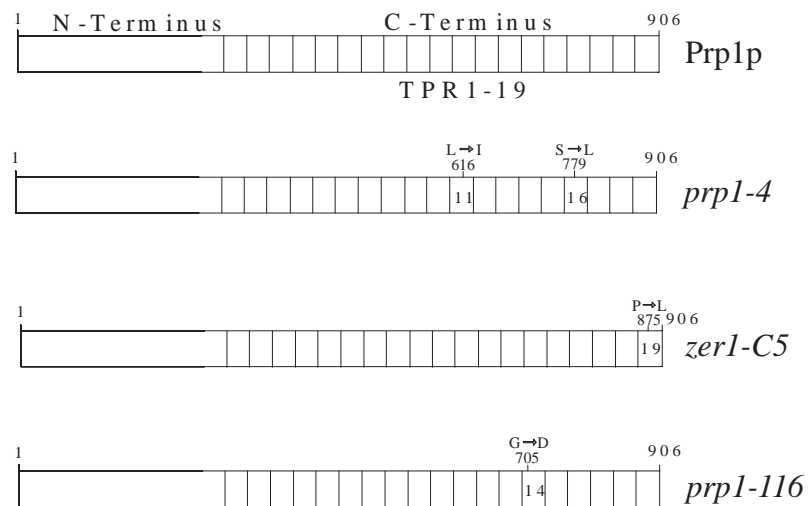
**Abb. 3.12** Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp8/cdc28-P8<sup>ts</sup>* bei 25 °C.

Die Tetradenanalyse ergab das *prp4-73<sup>ts</sup>* und *prp8/cdc28-P8<sup>ts</sup>* nicht miteinander interagieren. Alle Sporen der Tetraden wuchsen bei der permissiven Temperatur zu Kolonien aus (eine Auswahl von Tetraden in Abb. 3.12; Material und Methoden

Kap. 5.10.1) d. h., *prp4-73<sup>ts</sup>* und *prp8/cdc28-P8<sup>ts</sup>* sind im selben genetischen Hintergrund nicht synthetisch letal.

### 3.1.7 *prp1*-ts-Mutanten interagieren mit *prp4-73<sup>ts</sup>*

*prp1* ist essentiell für das Wachstum von *S. pombe*. Es liegt auf Chromosom II und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 906 Aminosäuren. Prp1p besteht aus 19 sogenannten tetratricopeptid repeat-Motiven (TPR) (Abb. 3.13) (Urushiyama *et al.*, 1997). Die TPR-Motive bilden helikale Strukturen aus, die zur Interaktion mit anderen Proteinen dienen (Lamb *et al.*, 1995).



**Abb. 3.13** Schematische Darstellung der untersuchten *prp1*-Mutanten. Die TPR-Motive sind im C-Terminus durch Kästchen angedeutet. Die mit Zahlen gekennzeichneten TPR-Motive tragen eine Punktmutation. Unter jedem Schema ist die Wildtyp Aminosäure und die in den Mutanten vorhandene Aminosäure angegeben (Urushiyama *et al.* 1997).

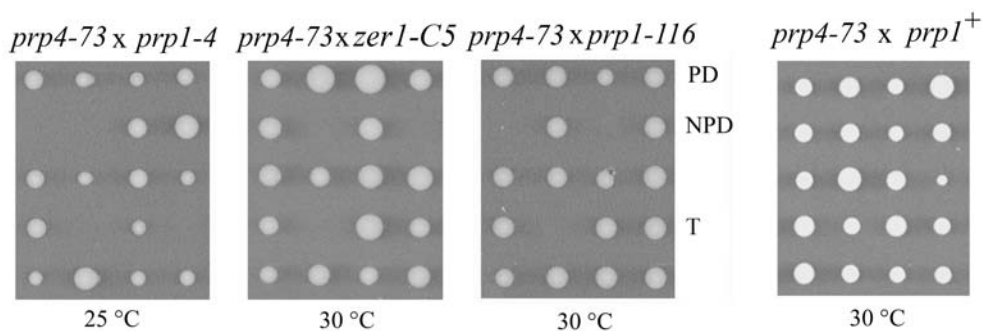
Im *prp1-4<sup>ts</sup>* Allel wurden zwei Punktmutationen identifiziert. Im TPR11 befindet sich eine Punktmutation an Aminosäureposition 616. An dieser Stelle wird ein Isoleucin statt einem Lysin im Protein eingebaut. Im TPR16 befindet sich die zweite

Punktmutation an Aminosäureposition 779. Dort wird ein Leucin statt einem Serin in das Protein eingebaut (Abb. 3.13) (Urushiyama *et al.*, 1997).

Bei der Suche nach Zellzyklusmutanten, die bei der restriktiven Temperatur in einer Zellzyklusphase arretieren, wurde eine Mutante identifiziert, die mit *zer1-C5<sup>ts</sup>* bezeichnet wurde (Okazaki *et al.*, 1990). Spätere Untersuchungen zeigten, daß *zer1-C5<sup>ts</sup>* allelisch zu *prp1* ist (Urushiyama *et al.*, 1997). Das *zer1-C5<sup>ts</sup>*-Allel trägt eine Punktmutation im TPR19 an Position 875, die dazu führt, daß statt einem Prolin ein Leucin im Protein vorliegt (Abb. 3.13).

Das *prp1-116<sup>ts</sup>* Allel trägt eine Punktmutation im TPR14. Im Vergleich zur Wildtypsequenz ist an Position 705 der Proteinsequenz statt einem Glycin eine Asparaginsäure eingebaut (Abb. 3.13).

Alle drei *prp1<sup>ts</sup>* Allele akkumulieren bei der restriktiven Temperatur Prä-mRNA. Außerdem akkumuliert das *prp1-4<sup>ts</sup>* Allel unter restriktiven Bedingungen ebenso poly(A)<sup>+</sup> RNA im Kern (Urushiyama *et al.*, 1997). Das *zer1-C5<sup>ts</sup>* Allel scheint darüberhinaus einen Defekt im Zellzyklus anzuzeigen. Die Zellen arretieren mit abgerundeter Zellform, die charakteristisch für die G0-Phase des Zyklus ist (Urushiyama *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen lassen wiederum darauf schließen, daß es möglicherweise eine Verbindung zwischen dem Prä-mRNA-Spleißvorgang und dem Zellzyklus gibt.



**Abb. 3.14** Tetradenanalyse der Kreuzungen von *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp4-1<sup>ts</sup>*, *zer1-C5<sup>ts</sup>* bzw. *prp1-116<sup>ts</sup>* bei 25 °C bzw. bei 30 °C (links). Rechts Tetradenanalyse der Kreuzung von *prp4-73<sup>ts</sup>* mit *prp1<sup>+</sup>* bei 30 °C.

*prp4-73<sup>ts</sup>* zeigt mit *prp1-4<sup>ts</sup>*, *zer1-C5<sup>ts</sup>* und *prp1-116<sup>ts</sup>* bei der permissiven Temperatur im selben genetischen Hintergrund genetische Interaktion. Die Anzahl der einzelnen Tetradentypen entspricht dem Verhältnis von ungekoppelten Genen. Die Sporen der Doppelmutanten sind, abhängig von den betrachteten Allelen, bei verschiedenen permissiven Temperaturen synthetisch letal (eine Auswahl der Tetraden in Abb. 3.14; Material und Methoden Kap.5.10.1).

### 3.2 Extragene Suppressoren der Prp4p Proteinkinase

Ein Suppressor unterdrückt einen Phänotyp, der durch eine Mutation verursacht wurde. Dabei wird zwischen intragenen und extragenen Suppressoren unterschieden. Intragene Suppression bedeutet, daß der Mutationsphänotyp durch eine weitere Mutation im gleichen Gen aufgehoben wird. Wird ein Mutationsphänotyp durch eine weitere Mutation in einem anderen Gen aufgehoben, wird dies als extragene Suppression bezeichnet.

High-Copy-Suppressoren unterdrücken ebenfalls Mutationsphänotypen. Die Aufhebung des Phänotyps wird jedoch im Vergleich zu den intragenen und extragenen Suppressoren durch andere Wirkungsmechanismen verursacht. High-Copy-Suppressoren können Wildtypgene sein, die durch Überexpression den Mutationsphänotyp eines Gens supprimieren. Zur Identifizierung von High-Copy-Suppressoren wird genomische DNA eines Hefestamms in High-Copy-Plasmide kloniert und in die Zellen, mit dem mutierten Gen, transformiert. Unter restriktiven Bedingungen wird nach wachsenden Zellen gesucht. Die Wirkungsweise eines High-Copy-Suppressors eines *prp4*-Allels wird in Kapitel 3.3 (Seite 42) beschrieben.

Klassische extragene Suppressoren, außer nonsense-Suppressoren, wirken mit ihrem Interaktionspartner in einem Reaktionsprozeß. Dabei bedingt die Beteiligung in einem Prozeß keine direkte Interaktion der von diesen Genen kodierten Proteine. Es läßt sich jedoch aus experimentellen Untersuchungen die Vermutung ableiten, daß klassische extragene Suppressoren häufiger direkt mit ihrem Partner interagieren als synthetisch letale Interaktionspartner.

### 3.2.1 Suche nach extragenen Suppressoren der Prp4p Kinase

Zur Identifizierung von Suppressoren der Prp4p Kinase, wurde nach Mutanten des *prp4-73<sup>ts</sup>* Stamms gesucht, die den ts-Phänotyp supprimieren. Um Mutationen zu erzeugen, wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt. UV-Licht bewirkt die Bildung von Pyrimidin-Dimeren in der DNA. Die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen werden zerstört und zwei benachbarte Pyrimidine werden kovalent verknüpft. Durch die fehlerhafte DNA-Struktur kann es zum Einbau falscher Basen und damit zu Mutationen kommen.

Um Klone mit UV-induzierten Mutationen auf Suppressorfunktion zu testen, wurden die Zellen bei 36 °C inkubiert. Die wachsenden Klone wurden dann mit einem *prp4<sup>+</sup>*-Stamm gekreuzt. Die Tetradenanalyse dieser Kreuzung ermöglicht es, die Art der Reversion des Phänotyps zu bestimmen.

Handelt es sich bei der Suppression um eine Reversion der *prp4-73<sup>ts</sup>*-Punktmutation, verhält sich dieses Allel wie das Wildtypgen (Abb. 3.1 Seite 9). Die Tetradenanalyse ergibt dann für jeden Askus vier wachsende Sporen bei 36 °C.

Eine extragene Suppression liegt vor, wenn eine zweite Mutation außerhalb des *prp4-73<sup>ts</sup>* Allels auftritt, die den ts-Phänotyp bei 36 °C supprimiert.

Die Tetradenanalyse zur Bestimmung der Reversionsart wurde mit drei Suppressorstämmen durchgeführt. Diese Stämme wurden mit CS1, CS2 und CS3 bezeichnet. Die Abkürzung CS bedeutet, daß die Stämme bei 16 °C nicht mehr wachsen können. Sie sind kältesensitiv (CS= cold sensitive) (Schmidt *et al.*, 1999).

Es wurde ein *prp4<sup>+</sup>*-Stamm mit dem CS1-Stamm und mit dem CS2-Stamm gekreuzt. Die Tetradenanalyse beider Kreuzungen bei 36 °C zeigt, daß die Anzahl der Tetratypen die größte Klasse der zu erwartenden Tetradenklassen ist. Die Anzahl an Parentalen Ditypen ist gleich der Anzahl an Nichtparentalen Ditypen. Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Suppressorloci einer anderen Kopplungsgruppe angehören als *prp4-73<sup>ts</sup>* (Tab. 3.1). Beide Mutationen, die den ts-Phänotyp bei 36 °C supprimieren, liegen außerhalb des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allels. Die Suppressoren des CS1-Stammes und des CS2-Stammes sind daher extragene Suppressoren des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allels bei 36 °C.

Ebenso wurde ein *prp4*<sup>+</sup>-Stamm mit dem CS3-Stamm gekreuzt. Auch hier ist die Anzahl der Tetratypen die größte Klasse der zu erwartenden Tetradenklassen (Tab. 3.1). Auch diese Mutation liegt außerhalb des *prp4-73*<sup>ts</sup>-Allels. Der Suppressor des CS3-Stammes ist daher ein extragener Suppressor des *prp4-73*<sup>ts</sup>-Allels bei 36 °C.

**Tab. 3.1** Tetradenanalyse der Kreuzung *prp4*<sup>+</sup> mit den extragenen Suppressoren des *prp4-73*<sup>ts</sup>-Allels (Schmidt *et al.*, 1999).

Kreuzung	Anzahl der Tetraden <sup>1</sup>		
	PD	NPD	T
<i>prp4</i> <sup>+</sup> × <i>spp</i> (CS1) <sup>2</sup>	2	1	4
<i>prp4</i> <sup>+</sup> × <i>spp</i> (CS2) <sup>2</sup>	1	1	11
<i>prp4</i> <sup>+</sup> × <i>spp</i> (CS3) <sup>2</sup>	13	0	16

PD, Parentaler Dityp; NPD, Nichtparentaler Dityp; T, Tetratyp; *spp*, Suppressorgen.

<sup>1</sup> Inkubation der replikaplattierten Kolonien bei 36 °C. <sup>2</sup> Die Tetraden der Kreuzung werden ausgelegt und bei 25 °C inkubiert, replikaplattiert und bei 36 °C inkubiert.

### 3.2.2 Nachweis zweier unabhängiger extragener Suppressoren von *prp4-73*<sup>ts</sup>

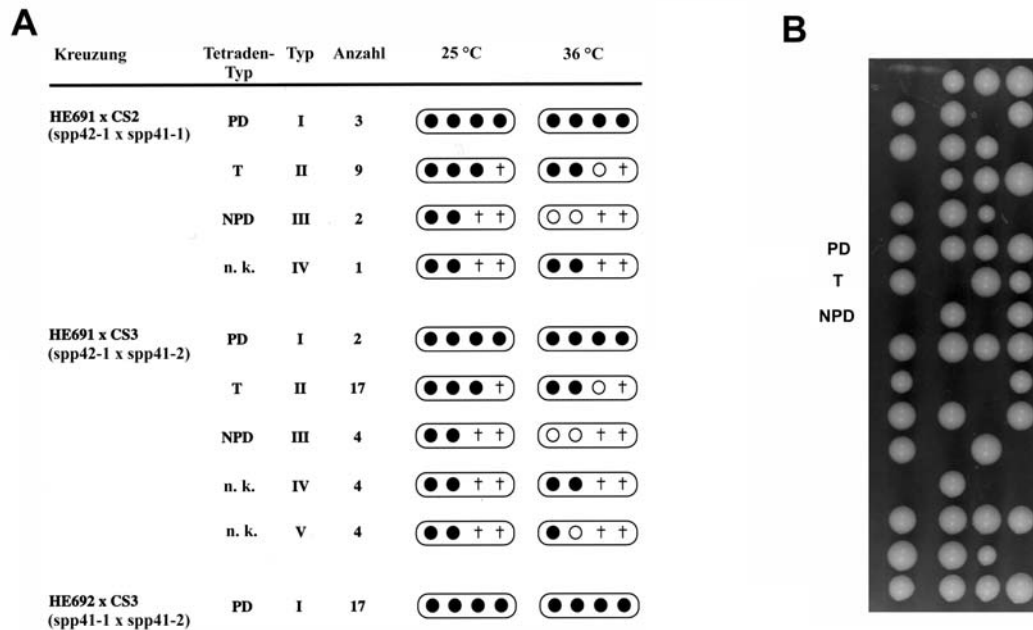
Durch Kreuzen der Suppressorstämme untereinander sollte geprüft werden, ob es sich bei den Suppressorloci um verschiedene Allele eines Gens handelt.

Um die Suppressorstämme untereinander kreuzen zu können, wurden Stämme mit entgegengesetztem Paarungstyp konstruiert, die mit HE691 und HE692 bezeichnet wurden.

Die Tetradenanalyse der Kreuzung HE692 mit CS3 ergab bei 36 °C ausschließlich Tetraden des Parentalen Dityps (Abb. 3.15 A unten). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Suppressorloci der Stämme allelisch sind. Die Suppressormutationen beider Stämme liegen in einem Gen. Ob die Mutationen an verschiedenen Positionen in der Basensequenz des Gens liegen, oder ob sie dieselbe Sequenzposition betreffen,

könnte nur eine Sequenzierung der DNA klären. Da die Loci allelisch sind, wurden sie mit *spp41-1* (HE692, CS2) und *spp41-2* (CS3) bezeichnet.

Von der Kreuzung HE691 mit CS2 und auch von der Kreuzung HE691 mit CS3 wurde eine Tetradenanalyse bei 36 °C durchgeführt. In beiden Untersuchungen ist die Anzahl der Tetratypen die größte Klasse der zu erwartenden Tetradenklassen. Die Anzahl der Parentalen Ditypen und der Nichtparentalen Ditypen ist gering (Abb. 3.15 A). Diese Beobachtung führt zu dem Schluß, daß die Suppressorloci nicht



**Abb. 3.15** (A) Die Tetradenanalyse der Kreuzung von den Suppressorstämmen HE691 (*spp42-1*), HE692 (*spp41-1*) und CS3 (*spp41-2*) untereinander (Schmidt *et al.*, 1999). Die Tetraden wurden bei 25°C inkubiert; Wachstumsverhalten siehe Spalte 25 °C. Anschließend replikaplattiert und bei 36°C inkubiert; Wachstumsverhalten siehe Spalte 36 °C. Gefüllter Kreis, wachsende Kolonie; Kreis, bei 36 °C, kein Wachstum der Kolonie; †, tote Spore, PD, Parentaler Dityp mit vier wachsenden Kolonien; NPD, Nichtparentaler Dityp mit zwei wachsenden Kolonien; T, Tetratyp mit drei wachsenden Kolonien; n.k., nicht klassifizierbare Tetrade. (B) Tetradenanalyse der Kreuzung von HE691 (*spp42-1*) mit CS3 (*spp41-2*) im Hintergrund von *prp4-73<sup>ts</sup>* bei 25 °C.

allelisch sind. Die Suppressormutationen betreffen verschiedene Gene. Ob beide Suppressorloci auf einem Chromosom sehr weit von einander entfernt liegen oder ob sie verschiedenen Kopplungsgruppen angehören, kann bei dieser Analyse nicht entschieden werden. Diese Möglichkeiten werden in Kapitel 3.2.4 näher untersucht. Da die Suppressorloci nicht allelisch sind, wurde der Suppressor des CS1-Stamms mit *spp42-1* (HE691, CS1) bezeichnet.

Auf Grund einer Überprüfung der publizierten Daten nach Schmidt *et al.* (1999) wurde in dieser Arbeit eine Umbenennung der Suppressornamen durchgeführt. Die Umbenennung der Suppressoren hat keinen Einfluß auf die Richtigkeit der publizierten Daten.

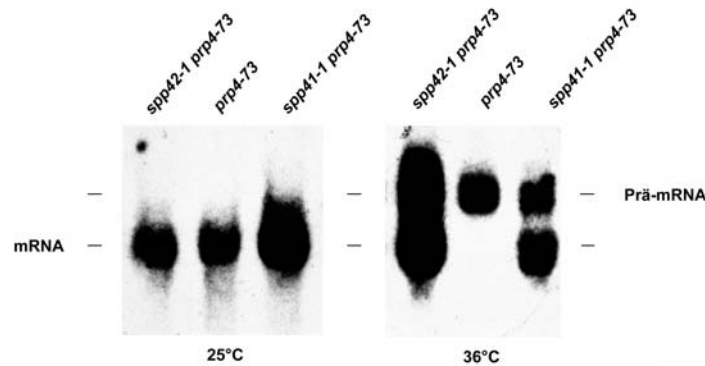
Die Tetradenanalyse der Kreuzung von HE691 mit CS2 und HE691 mit CS3 bei 25°C zeigte, daß *spp42-1* und *spp41-1* bzw. *spp42-1* und *spp41-2* im selben genetischen Hintergrund synthetisch letal sind (Abb. 3.15 A, Spalte 25 °C). Die Sporen die beide Suppressormutationen und *prp4-73<sup>ts</sup>* tragen, können bei der permissiven Temperatur nicht keimen. Das Ergebnis der Tetradenanalyse ist in Abb. 2.15 B am Beispiel der Kreuzung HE691 mit CS3 dargestellt.

### **3.2.3 Die extragenen Suppressoren unterdrücken den Spleißdefekt des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allels**

Die Stämme CS1 (*spp42-1 prp4-73<sup>ts</sup>*) und CS2 (*spp41-1 prp4-73<sup>ts</sup>*) sind in der Lage, bei der restriktiven Temperatur von 36 °C Prä-mRNA zu spleißen. Dies zeigte die Northern-Blot-Analyse der Gesamt-RNA nach Hybridisierung mit einer intronhaltigen radioaktiv markierten *dis2*-Sonde (Abb. 3.16).

Die Zellen der beiden Stämme wurden bei 25 °C und 3 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und in einem denaturierenden Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde mittels eines Northern-Blots auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit dem radioaktivmarkierten intronhaltigen *dis2* Fragment hybridisiert. Das *dis2* Gen kodiert für eine Proteinphosphatase und besitzt ein Intron mit einer Länge von 395 Basenpaaren (Ohkura *et al.*, 1989).





**Abb. 3.16** Autoradiogramm der Northern-Blot Analyse der Suppressorstämme CS1 (*spp42-1 prp4-73<sup>ts</sup>*) und CS2 (*spp41-1 prp4-73<sup>ts</sup>*) (Schmidt *et al.*, 1999). Beide CS-Stämme und der Kontrollstamm (*prp4-73<sup>ts</sup>*) wurden mit einem Plasmid transformiert, das das intronhaltige *dis2* Gen trägt. Es wurde Gesamt-RNA aus Zellen isoliert, die bei 25 °C inkubiert wurden, und aus Zellen, die für 3h bei 36 °C inkubiert wurden. Der Blot wurde mit radioaktivmarkiertem intronhaltigem *dis2* Fragment hybridisiert.

Das Autoradiogramm des Northern-Blots zeigt, daß die Stämme CS1 und CS2 bei 25 °C und bei 36 °C Prä-mRNA von *dis2* zu mRNA spleißen. Beide Suppressoren supprimieren den Spleißdefekt des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allels bei 36 °C (Abb. 3.16).

### 3.2.4 Bestimmung der Kopplungsgruppe von *spp41* und *spp42*

Die Spaltheefe besitzt drei Chromosomen. Um die Loci der Suppressoren im Genom zu charakterisieren, wurde zuerst die Kopplungsgruppe von *spp41* und *spp42* bestimmt. Dazu wird durch Tetradenanalyse ermittelt, mit welchen bekannten Markern der drei Chromosomen die Suppressoren gekoppelt sind (Material und Methoden Kap. 5.10.1).

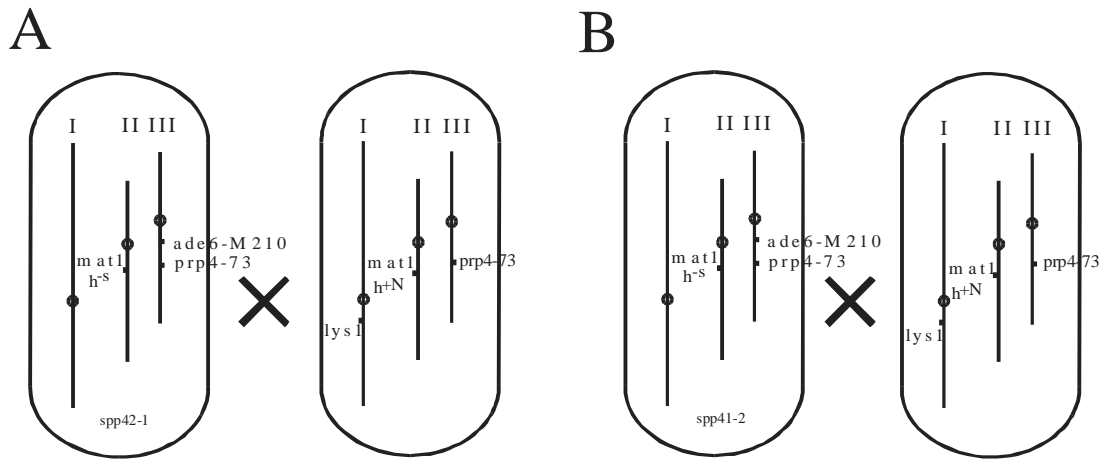
Je weiter zwei Gene voneinander entfernt sind, um so häufiger kommt es in der Meiose zu Rekombinationsereignissen zwischen den beiden Genen. Durch die erhöhte Rekombinationsrate erscheinen zwei weit voneinander entfernte Gene nicht mehr als gekoppelt, obwohl sie einer Kopplungsgruppe angehören. Alle zur Tetradenanalyse verwendeten Stämme tragen daher das *swi5-39* Allel, das die

Rekombinationshäufigkeit auf etwa 1/10 reduziert (Schmidt, 1993). Die herabgesetzte Rekombinationshäufigkeit ermöglicht nun die Bestimmung einer Kopplung und die Berechnung der Genabstände auch von sehr weit entfernten Genen einer Kopplungsgruppe. Diese Methode wird als „Longe-range-mapping“ bezeichnet (Schmidt, 1993).

Außerdem tragen alle verwendeten Stämme die *prp4-73<sup>ts</sup>*-Mutation.

Als bekannte Markergene wurden *lys1* für Chromosom I, *mat1* für Chromosom II und *ade6* für Chromosom III genutzt (Anhang Kap. 7.2). Die Stämme, die *lys1<sup>-</sup>* oder das *ade6-M210* Allel tragen sind auxotroph für die Stoffwechselprodukte Lysin bzw. Adenin. Diese Stoffwechsellmangelmutanten wachsen nur bei Zugabe von Lysin oder Adenin zum Medium. Der *mat1*-Locus ist einer von drei Paarungstyploci der Paarungstypregion (Beach, & Klar, 1984). Der *mat1*-Locus wird als einziger der drei Loci exprimiert und enthält die Plus-, oder die Minusinformation des Paarungstyps (Schmidt, & Gutz, 1994).

Zur Bestimmung der Kopplungsgruppe der Suppressoren wird durch Tetradenanalyse untersucht, wie häufig die Suppressoren durch Rekombination von den einzelnen Markergenen getrennt werden. Die Anzahl der Tetradenklassen gibt Aufschluß über eine Kopplung der betrachteten Gene oder über die freie Rekombination ungekoppelter Gene. Zur Bestimmung der Tetradenklasse einer Tetrade wird die Segregation der Markergene und der Suppressoren auf die Sporen der Tetrade bestimmt. Dies erfolgt durch Replikaplattierung der gekeimten Tetraden auf Minimalmedium bei 25 °C, auf Vollmedium bei 36 °C und durch Bestimmung des Paarungstyps der Kolonien (Material und Methoden Kap. 5.10.1). Das Wachstumsverhalten der vier Sporen und ihr Paarungstyp zeigen den Tetradentyp an. Die Kreuzungen wurden mit den in Abb. 3.17 angegebenen Hefestämmen durchgeführt.



**Abb. 3.17** Schematische Darstellung der gekreuzten Stämme zur Kopplungsgruppenbestimmung von *spp42* und *spp41* im *prp4-73<sup>ts</sup>* und *swi5-39* Hintergrund. (A) Bestimmung der Kopplung von *spp42-1*. (B) Die Bestimmung der Kopplung von *spp41-2*. Die Chromosomen des Genoms werden mit römischen Zahlen benannt. Der Kreis gibt die Lage des Centromers an. Die relative Lage der Markergene ist durch Striche angedeutet (Allelnamen sind zu Gunsten der besseren Lesbarkeit hier nicht kursiv geschrieben).

In Abb. 3.18 ist beispielhaft die Auswertung der Tetraden in Bezug zum *lys1* Markergen dargestellt.

Aus der erhaltenen Anzahl der Tetradentypen wurde ersichtlich, daß sowohl *spp41*, wie auch *spp42* mit dem *lys1* Gen gekoppelt sind (Tab. 3.2). Da das *lys1* Gen auf Chromosom I liegt, sind beide Suppressorloci auf Chromosom I lokalisiert.

*ade6* und *mat1* sind nicht mit den Suppressorloci gekoppelt. Die Anzahl der Tetradentypen entspricht dem erwarteten Verhältnis von ungekoppelten Genen (Tab. 3.2).

Gene	Tetraden- klasse	Vollmedium 25 °C	Replika jeweils auf →	Wachstumsverhalten auf	
				Vollmedium 36 °C	Minimal- medium ohne Lysin
<i>spp41</i> – <i>lys1</i>	PD				
	NPD				
	T				
<i>spp42</i> – <i>lys1</i>	PD				
	NPD				
	T				

**Abb. 3.18** Tetradenanalyse zur Bestimmung einer Kopplung von *lys1* und den Suppressoren *spp42* bzw. *spp41* im *prp4-73<sup>ts</sup>* Hintergrund. Die Tetraden wurden bei 25 °C inkubiert. Anschließend replikaplatziert und auf Vollmedium bei 36 °C (siehe Spalte 36 °C) bzw. auf Minimalmedium bei 25 °C (siehe Spalte Medium ohne Lysin) inkubiert. Wachsende Kolonien sind mit gefüllten Kreisen, die toten Kolonien mit Kreuz dargestellt.

**Tab. 3.2** Kopplungsgruppenbestimmung des *spp42* und des *spp41* Suppressors.

Gene	Anzahl der Tetraden			Chromosom
	PD	NPD	T	
<i>spp42</i> – <i>lys1</i>	<b>34</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	I
<i>spp42</i> – <i>mat1</i>	16	7	18	II
<i>spp42</i> – <i>ade6</i>	18	14	10	III
<i>spp41</i> – <i>lys1</i>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	I
<i>spp41</i> – <i>mat1</i>	9	11	19	II
<i>spp41</i> – <i>ade6</i>	12	9	14	III

Die zur Kreuzung verwendeten Stämme tragen alle das *prp4-73<sup>ts</sup>*-, und *swi5-39*-Allel.

### 3.2.5 Bestimmung der Genabstände zwischen den Suppressorloci und den Markergenen

Zur Bestimmung der Lage der Suppressorloci auf Chromosom I wurden die Genabstände zu den Markergenen *ura1*, *his6*, *lys1* und *ade4* bestimmt (Abb. 3.19) (Anhang Kap. 7.2). Die Gene *ura1* und *his6* liegen auf dem langen linken Arm von Chromosom I. *lys1* und *ade4* liegen auf dem kurzen rechten Arm des Chromosom I. *ura1* und *ade4* liegen an den Enden des Chromosoms, *his6* und *lys1* liegen proximal zum Centromer.



**Abb. 3.19** Schematische Darstellung des Chromosom I. Links vom Kreis, linker langer Arm des Chromosoms. Rechts vom Kreis, rechter kurzer Arm des Chromosoms. Der Kreis markiert die Lage des Centromers. Durch Striche ist die relative Lage der Markergene angedeutet.

Die zur Kreuzung verwendeten Stämme tragen die Allele *ade4-31*, *lys1<sup>-</sup>*, *ura1-171* und *his6-365*. Sie sind auxotroph für die Stoffwechselprodukte Adenin, Lysin, Uracil und Histidin und können nur bei Zugabe dieser Supplemente zum Medium wachsen. Ebenso tragen alle Stämme das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel und wiederum das *swi5-39*-Allel, um die Rekombinationshäufigkeit herabzusetzen (Schmid, 1993).

Durch die Tetradenanalyse der Kreuzung wird bestimmt, wie häufig eine Rekombination zwischen den Suppressorloci und den Markergenen auftritt. Die Segregation der Markergene und der Suppressoren wird durch Replikaplattierung der Tetraden auf Minimalmedium bei 25 °C und auf Vollmedium bei 36 °C bestimmt. Das Wachstumsverhalten der vier Sporen ermöglicht die Zuordnung der Tetrade in eine Tetradenklasse.

Die Bestimmung der Anzahl von Rekombinationsereignissen zwischen zwei Genen ermöglicht die Berechnung des Abstands beider Gene. Dieser wird in Morgan-Einheiten angegeben. Die Morgan-Einheit ist ein nach dem Genetiker Thomas Hunt

Morgan benanntes Maß für die Häufigkeit der Rekombination zwischen zwei Genen. Die Angabe in Morgan-Einheiten beruht auf der Beobachtung, daß Rekombinationsereignisse um so häufiger auftreten, je weiter die Gene voneinander entfernt liegen. Ein Centimorgan ist definiert, als der Genabstand in dem 1 % Rekombinationsereignisse auftreten. Es erfolgt also zwischen zwei Genen mit einem Abstand von 1 Centimorgan (cM) in 100 untersuchten Meiosevorgängen ein Rekombinationsereignis.

Die Anzahl der Rekombinationsereignisse wird in der Tetradenanalyse durch die Anzahl der verschiedenen Tetradentypen angezeigt. Dabei erfordert der Parentale Dityp kein Crossing-over, der Tetratyp ein Crossing-over und der Nichtparentale Dityp zwei Crossing-over. Darüberhinausgehende Mehrfachcrossing-over werden jedoch nicht erfaßt. In der Analyse erscheint zum Beispiel ein Dreifachcrossing-over als Tetratyp und ein Vierfachcrossing-over als Nichtparentaler Dityp. Bei der Berechnung der Genabstände müssen daher geeignete Korrekturen vorgenommen werden. Die Berechnung der Genabstände erfolgt nach der Formel von Perkins (1949):

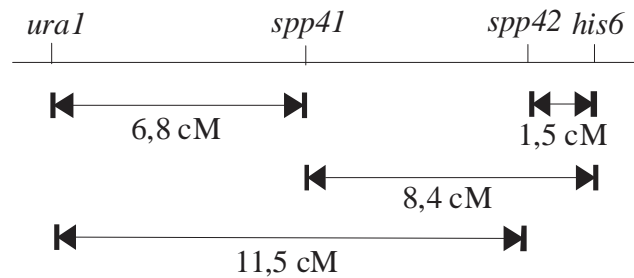
$$\text{Genabstand} = \frac{50 (T + 6 \text{ NPD})}{(\text{PD} + T + \text{NPD})}$$

Die Tetradenanalyse zeigt, daß die Anzahl der Parentalen Ditypen die größte der Tetradentypen ist (Tab. 3.3). Je größer der Abstand der betrachteten Gene ist, um so mehr Rekombinationen erfolgen. Daher steigt die Anzahl der Nichtparentalen Ditypen und Tetratypen (Tab. 3.3). Die Abstände zwischen *spp41* bzw. *spp42* und den Markergenen zeigen, daß die Suppressorloci auf dem linken Arm von Chromosom I lokalisiert sind. Sie liegen zwischen dem *ura1* und dem *his6* Gen (Tab 3.3 und Abb. 3.20).

**Tab. 3.3** Bestimmung der Genabstände zwischen den Suppressoren und den Markergenen (Schmidt *et al.*, 1999).

Gene	Anzahl der Tetraden			Rekombinations- frequenz
	PD	NPD	T	
<i>spp42 – ura1</i>	130	1	32	11,5
<i>spp42 – his6</i>	164	0	4	1,5
<i>ura1 – his6</i>	111	1	29	12,4
<i>spp42 – lys1</i>	141	1	35	12,4
<i>spp42 – ade4</i>	39	5	63	43,5
<i>ade4 – lys1</i>	45	4	59	38,5
<i>spp41 – ura1</i>	32	0	5	6,7
<i>spp41 – his6</i>	33	0	6	8,4
<i>ura1 – his6</i>	26	0	12	15,7
<i>spp41 – lys1</i>	24	0	10	14,7
<i>spp41 – ade4</i>	11	1	22	41,2
<i>ade4 – lys1</i>	15	0	22	29,7

Berechnung der Rekombinationsfrequenz nach der Formel von Perkins (1949) :  $50 \cdot (T + 6NPD) / (PD + T + NPD)$ . PD, Parentaler Dityp; NPD, Nichtparentaler Dityp; T, Tetratyp. Alle zur Kreuzung verwendeten Stämme tragen das *swi5-39* Allel, d.h. die Rekombinationsfrequenz ist um Faktor 10 reduziert (Schmidt, 1993).



**Abb. 3.20** Schematische Darstellung des Chromosom I. Durch Striche ist die relative Lage der Markergene und der Suppressorloci angedeutet. Die Genabstände (ermittelt im *swi5-39*-Hintergrund) sind unterhalb des Schemas angegeben (Abstände nicht maßstabsgetreu dargestellt).

Diese Ergebnisse ermöglichten nun den Genabstand zu einem weiteren Gen zu bestimmen, ohne wie zuvor durch Verwendung des *swi5-39*-Allels die Rekombinationshäufigkeit herabzusetzen (Seite 28).

Es handelte sich hierbei um das *arg3* Gen, das sich zwischen dem *his6*, und dem *ura1* Gen auf Chromosom 1 befindet. Die Tetradenanalyse wurde mit Stämmen durchgeführt, die das *swi5*-Wildtypallel trugen. Die Häufigkeit der Rekombinationsereignisse wurde in diesem Versuch nicht herabgesetzt.

Die Häufigkeit der Rekombinationsereignisse zwischen den Suppressorgenen und dem *arg3*-, und wiederum dem *his6*-Gen wurde, ebenfalls wie auf Seite 32 beschrieben, durch Tetradenanalyse der Kreuzungen bestimmt und der Genabstand nach der Formel von Perkins (1949) berechnet (Tab. 3.4).

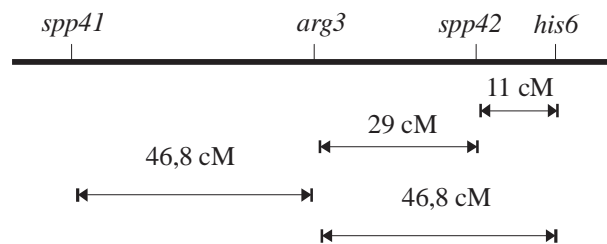


**Tab. 3.4** Bestimmung der Genabstände zwischen den Suppressoren und den Markergenen *arg3* und *his 6*.

Gene	Anzahl der Tetraden			Rekombinations- frequenz
	PD	NPD	T	
<i>spp42 – arg3</i>	38	2	27	29
<i>spp42 – his6</i>	54	0	17	11
<i>arg3 – his6</i>	30	5	17	43,9
<i>spp41 – arg3</i>	24	4	35	46,8
<i>spp41 – his6</i>	19	8	29	68,7
<i>arg3 – his6</i>	29	5	29	46,8

Berechnung der Rekombinationsfrequenz nach der Formel von Perkins (1949) :  $50 (T + 6NPD) / (PD + T + NPD)$ . PD, Parentaler Dityp; NPD, Nichtparentaler Dityp; T, Tetratyp. Alle zur Kreuzung verwendeten Stämme tragen das *swi5*-Wildtypallel.

Die erhaltenen Genabstände zeigen, daß sich *spp42* zwischen *his6* und *arg3* befindet und sich *spp41* links von *arg3* befindet (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21** Schematische Darstellung des Chromosom I. Durch Striche ist die relative Lage der Markergene und der Suppressorloci angedeutet. Die Genabstände (ermittelt im *swi5*-Wildtyp Hintergrund) sind unterhalb des Schemas angegeben (Abstände sind nicht maßstabsgetreu dargestellt).

### 3.2.6 Identifizierung der Suppressoren

Es wurde festgestellt, daß die Suppressormutationen dominant über die Wildtyp-suppressorgene sind. Hierzu wurden diploide Zellen durch Kreuzung des jeweiligen Suppressorstamms mit einem *prp4-73<sup>ts</sup>* Stamm hergestellt:

$$\begin{array}{l} h^{-S}/h^{+N} \text{ } spp41-1/spp41^{+} \text{ } prp4-73^{ts}/prp4-73^{ts} \\ h^{-S}/h^{+N} \text{ } spp42-2/spp42^{+} \text{ } prp4-73^{ts}/prp4-73^{ts} \end{array}$$

Beide Stämme, die heterozygot für *spp41* bzw. *spp42* sind, wurden unter restriktiven Bedingungen auf Wachstum getestet. Sowohl *spp41* und auch *spp42* ist dominant über *spp41<sup>+</sup>* bzw. *spp42<sup>+</sup>*, so daß beide Stämme unter diesen Bedingungen wachsen können (Käufer, N. F., persönliche Mitteilung).

In den letzten Jahren wurde mehrfach versucht die Suppressorgene zu isolieren (Käufer, N. F., persönliche Mitteilung). Hierzu wurde genomische DNA aus dem *spp42*-Stamm (CS1) bzw. *spp41*-Stamm (CS2) in High-Copy-Plasmide kloniert, in einen *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm transformiert und bei 36 °C inkubiert. Aus wachsenden Kolonien wurden die Plasmide isoliert und die Insertionen partiell sequenziert. Dabei zeigte sich, daß jedoch alle isolierten Plasmide das *prp4* Gen trugen. Ein Suppressor gen konnte nicht isoliert werden (Groß, T. persönliche Mitteilung).

Eine mögliche Fehlerquelle stellt die Herstellung der Genbanken dar. Die chromosomale DNA wurde partiell mit *Sau3A* verdaut und über einen Gradienten aufgetrennt. Aus diesem Gradienten wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von ungefähr 3 - 5 kb isoliert und in die High-Copy-Plasmide kloniert. Möglicherweise sind die Suppressorgene größer als 3 - 5 kb, so daß zu kleine Fragmente der DNA kloniert wurden und deshalb kein funktionsfähiges Protein exprimiert werden kann.

Das Genomprojekt *S. pombe* wurde im letzten Jahr abgeschlossen und die Sequenz im Februar 2002 veröffentlicht (Wood *et al.*, 2002). Die DNA-Sequenzen sind per Internet in der Datenbank des Sanger Centres zugänglich (<http://www.sanger.ac.uk>). Die DNA des gesamten Genoms liegt verpackt in Cosmiden vor. Die Abfolge der Cosmide wurde durch Identifizierung von überlappenden Sequenzen auf den Cosmiden für jedes Chromosom festgelegt.

In der Datenbank des Sanger Centres ist das *his6* Gen auf Cosmid SPAC3F10 des Chromosom I lokalisiert. Ausgehend von *his6* wurde die Sequenz des Chromosoms

nach Genen in „Richtung“ der Telomersequenzen durchsucht, deren Annotationen auf eine Funktion im Prä-mRNA Spleißen hinweisen.

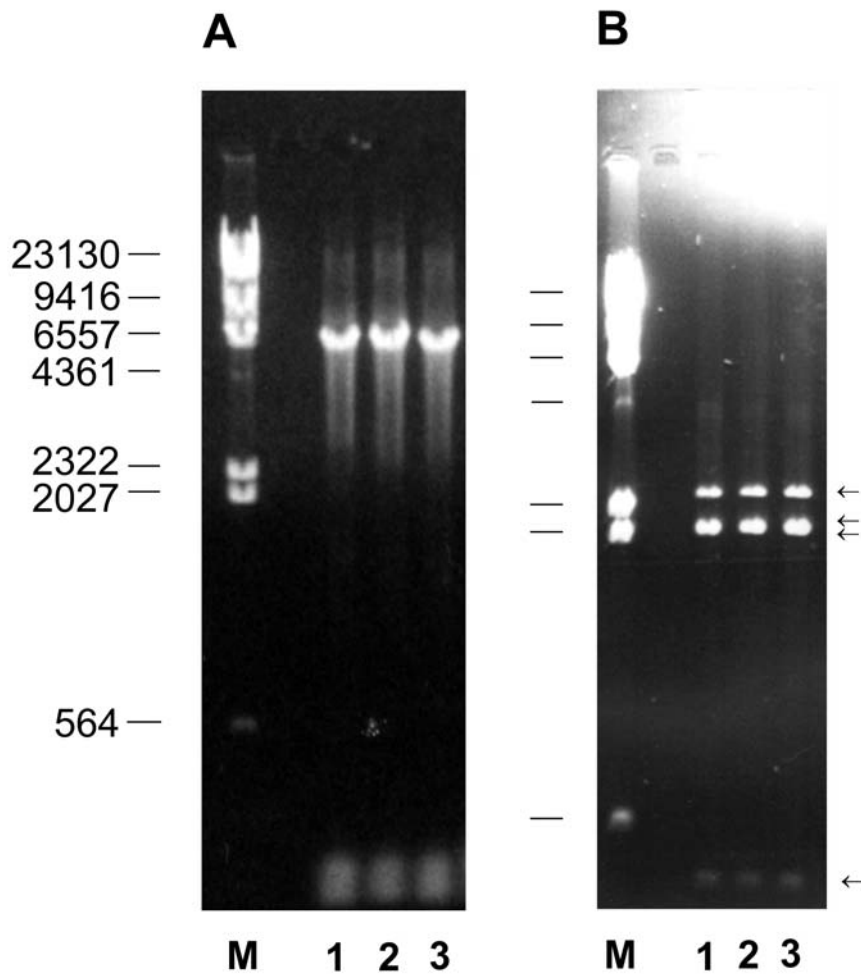
Auf Cosmid SPAC4F8 wurde ein offenes Leseraster mit einer Größe von 2363 Aminosäuren identifiziert. Dieses offene Leseraster zeigt über 60 % identische Aminosäuren im Vergleich mit einer Aminosäuresequenz aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das von dieser Sequenz kodierte Protein wird als Prp8p bezeichnet. Das *PRP8* Gen ist essentiell für den Prä-mRNA-Spleißvorgang. Prp8p ist möglicherweise als zentrales Protein an der Regulation der Umlagerungsprozesse des Spleißosoms beteiligt (Collins, & Guthrie, 1999; Kuhn, & Brow, 2000).

Beide Suppressoren kartieren in dieser Chromosomenregion, so daß möglicherweise einer der beiden Suppressoren von diesem offenen Leseraster kodiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde das Gen aus beiden Suppressorenstämmen und einem Wildtypstamm isoliert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die kodierende Region des Gens amplifiziert (Kap. 5.7.10). Um zu testen, ob es sich um die gewünschten PCR-Fragmente handelt, wurden die Fragmente mit *EcoRI* verdaut (Abb. 3.22 B). Die PCR-Produkte mit einer Größe von 7 kb wurden anschließend unter der Kontrolle des thiaminregulierbaren *nmt1* Promotors in einen Expressionsvektor kloniert (Abb. 3.22 A) (Maundrell *et al.*, 1993; Zurlinden *et al.*, 1997).

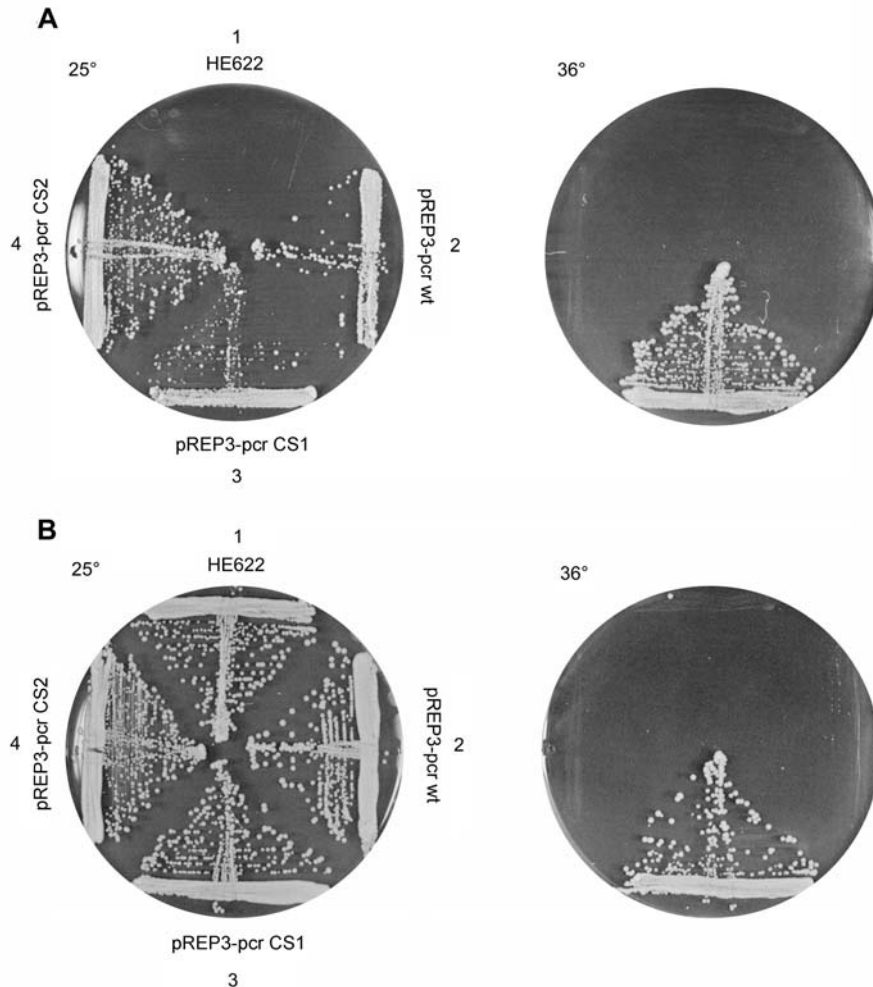
Die Expressionsvektoren mit den DNA-Fragmenten aus beiden Suppressorstämmen und dem Wildtypstamm wurden dann in einen *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm transformiert und bei 25 °C inkubiert.

Die Kolonien der Transformanten wurden auf thiaminhaltigem Medium ohne Leucin ausgestrichen und bei 25 °C inkubiert. Durch den Entzug von Leucin wurde auf leucinprototrophe Kolonien selektiert und gleichzeitig durch Thiaminzugabe der *nmt1*-Promotor reprimiert. In diesem Falle wurde dadurch die Expression der Gene auf ein geringes Maß reduziert. Unter diesen Bedingungen führten alle drei Plasmide zum Wachstum von Kolonien (Abb. 3.23 A links).

Ebenfalls wurden die wachsenden Kolonien auf thiaminhaltigem Medium ohne Leucin bei 36 °C inkubiert. Die Inkubation bei der restriktiven Temperatur wurde durchgeführt, um zu testen, ob eines der Fragmente aus dem *spp41*-, oder *spp42*-Stamm die *prp4-73<sup>ts</sup>* Mutation supprimiert.



**Abb. 3.22** (A) PCR-Fragmente aus den Suppressorstämmen und dem Wildtypstamm. Fragmente umfassen ORF des Prp8p-Homologen auf Cosmid SPAC4F8.12c (Schmidt *et al.*, 1999). Die chromosomale DNA folgender Stämme wurde zur PCR verwendet: Spur 1, Wildtypstamm; Spur 2, CS1-Suppressorstamm (*spp42-1*); Spur 3, CS2-Suppressorstamm (*spp41-1*); M, *Hind*III verdaute  $\lambda$ -DNA; zur Auftrennung der Fragmente wurde ein 1 % Agarose-Gel verwendet. (B) PCR-Fragmente mit *Eco*RI verdaut. Wie nach der Datenbanksequenz erwartet, ergeben sich vier Fragmente mit einer Größe von 2,465, 2,161, 2,159 und 0,215 kb (Pfeile).



**Abb. 3.23** Wachstumstest des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes bei der restriktiven Temperatur nach Transformation mit den möglichen Suppressorfragmenten (Schmidt *et al.*, 1999). 1: HE622, *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm ohne Plasmid; 2: *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm mit pREP3, der das PCR-Fragment des Wildtypstammes enthält; 3: *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm mit pREP3, der das PCR-Fragment des *spp42*-Stammes (CS1) enthält; 4: *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm mit pREP3, der das PCR-Fragment des *spp41*-Stammes (CS2) enthält. (A) Inkubation der Zellen bei 25 °C und 36 °C auf Medium ohne Leucin zur Selektion auf die Plasmide. Das Medium enthält Thiamin, um die Expression gering zu halten. (B) Inkubation der Zellen bei 25 °C und bei 36 °C auf Vollmedium.

Es zeigte sich, daß nur die Zellen, die das Plasmid mit dem *spp42*-Fragment tragen bei 36 °C zu Kolonien heranwachsen. Das bedeutet, daß nur das *spp42*-Fragment den *prp4-73<sup>ts</sup>* Phänotyp bei der restriktiven Temperatur supprimiert (Abb. 3.23 A rechts).

Daraus ist zu schließen, daß das 7 kb PCR-Fragment des *spp42*-Suppressorstamms den extragenen Suppressor von *prp4-73<sup>ts</sup>* trägt.

Dies Ergebnis ist ebenfalls unter nicht-selektiven Bedingungen zu beobachten. Nur die Zellen, die das Plasmid mit dem Fragment aus dem *spp42*-Stamm tragen, wachsen bei 36 °C zu Kolonien heran (Abb. 3.23 B rechts).

Die Identifizierung von *spp41* ist bisher noch nicht erfolgt. Die Kartierungsdaten weisen darauf hin, daß das Suppressorgen sich auf einem Cosmid befindet, das zwischen *arg3* auf Cosmid SPAC4G9 und *ura1* auf Cosmid SPAC11D3 befindet (Abb. 3.21 Seite 36).

### 3.2.7 Vergleich der ermittelten Genabstände zwischen *spp42* und den Markergenen mit den Sequenzabständen der Gene in der Datenbank

Die in der Tetradenanalyse ermittelten Genabstände zwischen dem Suppressor *spp42* und den Markergenen *arg3* und *his6* wurden nun mit den Sequenzabständen zwischen dem ORF des Prp8p-Homologen, das von *spp42* kodiert wird, und *arg3* und *his6* in der Datenbank verglichen (Tab. 3.5).

**Tab. 3.5** Vergleich der in der Tetradenanalyse ermittelten Genabstände mit den Sequenzabständen der Gene in der Datenbank und den daraus berechneten Abständen nach Munz *et al.*, 1989.

Gene	ermittelte Rekombinationsfrequenz im <i>swi-5<sup>+</sup></i> -Hintergrund	Abstand der Gene in kb (Sanger Centre)	Rekombinations- frequenz nach Munz <i>et al.</i> , 1989
<i>arg3 – spp42</i>	29	379	37,8
<i>his6 – spp42</i>	11	191	19
<i>arg3 – his6</i>	43,9	570	56,8

Die Sequenzabstände der Gene wurde durch Addition der einzelnen Cosmidgrößen berechnet. Der Abstand der Markergene *arg3* und *his6* war durch Tetradenanalyse nach Munz *et al.* (1989) in Centimorgan bekannt. Daher war es möglich auch den Sequenzabstand von *his6* zu *spp42* und von *arg3* zu *spp42* auf Grundlage der Daten von Munz in Centimorgan umzurechnen (Tab. 3.5 rechte Spalte).

Die in der Tetradenanalyse ermittelten Genabstände (Tab. 3.5 linke Spalte) stimmen annähernd mit den, aus den Sequenzabständen, berechneten Abständen überein. Darüberhinaus wird der in Abschnitt 3.2.5 genetisch ermittelte Abstand zwischen *spp42* und *his6* im *swi5-39*-Hintergrund bestätigt (Tab. 3.3 Seite 34).

Alle genetischen und molekularbiologischen Ergebnisse weisen daraufhin, der extragene Suppressor *spp42* für ein Homolog von Prp8p aus *S. cerevisiae* kodiert.

### **3.3 High-Copy-Suppressor der Prp4p Proteinkinase**

#### **3.3.1 Regulation der Prp4p Kinaseaktivität über den Zellzyklus ?**

Sequenzvergleiche zeigen, daß die Prp4p Kinase strukturell große Ähnlichkeit zu den katalytischen Domänen von Cyclin abhängigen Kinasen (CDK's) zeigt. Nach dieser Klassifizierung von Kinasen gehört Prp4p zu den CDC2-ähnlichen Kinasen (CLK, CDC2-like kinase) (Hanks, & Hunter, 1995). Zu dieser Klasse gehören ebenfalls Clk1 und SRPK1 aus Säugetieren, die indirekt am Prä-mRNA-Spleißvorgang beteiligt sind (Colwill *et al.*, 1996; Gui *et al.*, 1994).

Bisher war nicht bekannt, auf welche Weise die Aktivität der Prp4p Kinase in der Zelle reguliert wird.

Die Regulation der Aktivität kann auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. Zum Einen kann die Höhe der Kinaseproteinkonzentration in den verschiedenen Zellzyklusphasen reguliert sein. Dabei steigt und sinkt die Aktivität der Kinase mit der Proteinmenge. Zum Anderen wäre eine Regulation der Aktivität durch Modifikation des Kinaseproteins abhängig von den Zyklusphasen denkbar. Hierbei würde die

Aktivität zum Beispiel durch Phosphorylierung und/oder Inhibitoren und Aktivatoren verändert.

Um zu untersuchen, ob die Proteinmenge von Prp4p während eines Zellzyklus schwankt, wurde der Prp4p-Anteil an der Gesamtproteinmenge im Zellextrakt mittels einer Westernblot-Analyse bestimmt. Hierzu wurde die mit Linkern versehene cDNA von *prp4* unter der Kontrolle des thiaminregulierbaren *nmt41*-Promotors (no message with Thiamine) (Basi *et al.*, 1993) in den Hemagglutinin (HA)-Fusionsvektor pRHA42S\* kloniert (Material und Methoden Kap. 5.5.1). Dieses Konstrukt wurde durch homologe Rekombination über das *ura4*<sup>+</sup> Gen des Vektors in den *ura4-294*-Locus eines Wildtypstammes integriert. Die erfolgreiche Integration des Konstrukts wurde durch Wachstum auf Uracilmangelmedium und durch Nachweis des HA-Fusionsproteins in der Western-Analyse nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Integration in den *ura4-294* Locus durch eine PCR-Reaktion nachgewiesen.

Nach Thiaminentzug exprimierten die Zellen HA-getaggtetes Prp4p<sup>+</sup>, das durch Immunreaktion mit monoklonalen HA-Antikörpern nachzuweisen ist.

Die Beobachtung der Proteinkonzentration von Prp4p über einen Zellzyklus erfordert es, die Zellen zu synchronisieren. Hierzu wurde das temperatursensitive Allel *cdc10-129* in den HA-*prp4*<sup>+</sup>-Stamm eingekreuzt. *Cdc10* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen bewirkt, die spezifisch in der G1-Phase und S-Phase des Zellzyklus benötigt werden. Bei der restriktiven Temperatur arretieren die Zellen des ts-Allels in der G1-Phase (Aves *et al.*, 1985).

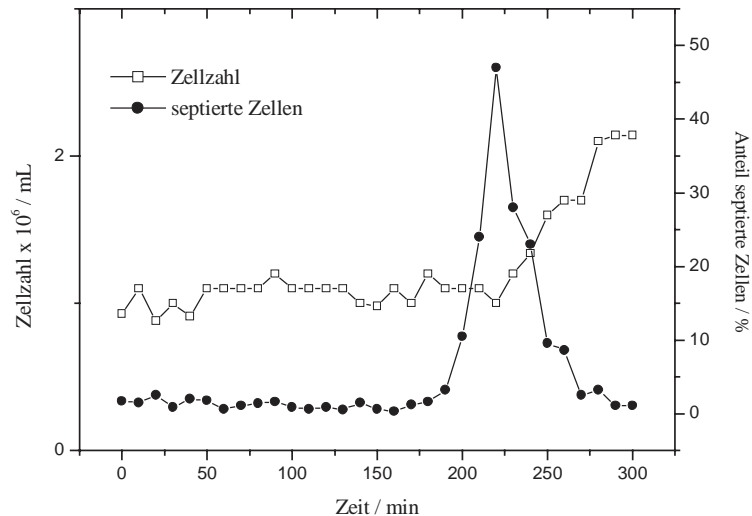
Deshalb wurden die Zellen des HA-*prp4*<sup>+</sup>-Stammes zur Arretierung für vier Stunden bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur heruntergekühlt und bei 25 °C inkubiert. Jeweils in 10 Minuten-Abständen wurde aus der Kultur eine Probe entnommen. Der Ablauf des Zellzyklus wurde durch Bestimmung der Zellzahl und des Anteils an septierten Zellen jeder Probe verfolgt (Abb. 3.24 ).

Zum Nachweis der Prp4p-Proteinkonzentration über einen Zellzyklus wurde mit den Proteinen der Proben eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Glasperlen aufgeschloßen und Proteinextrakt hergestellt. Von jeder Probe wurde dann die gleiche Konzentration an Gesamtprotein auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Elektro-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.



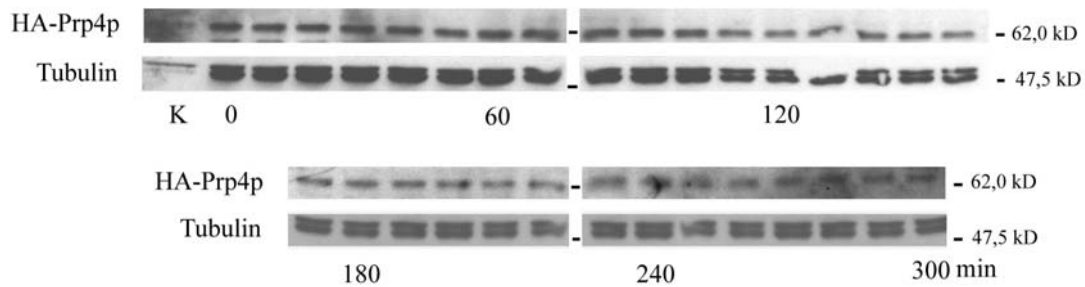
Die Membran wurde zum Nachweis des HA-Prp4p<sup>+</sup>-Fusionsproteins mit HA-Antikörpern inkubiert (Abb. 3.25).

Die Auftragung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit zeigt, daß sich die Zellzahl in 4,5h bei 25 °C erwartungsgemäß einmal verdoppelt hat. An der Verdopplung der Zellzahl wird deutlich, daß die Zellen einmal den Zellzyklus komplett durchlaufen haben. Der Anteil an septierten Zellen lag nach 230 min bei 49 % (Abb. 3.24). Dies bedeutet, daß 49 % der Zellen synchron einmal den Zellzyklus durchlaufen haben.



**Abb. 3.24** Graphische Darstellung der Zellzahl/mL und des Anteils der septierten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Synchronisation bei 36 °C.

Der Anteil der synchronisierten Zellen liegt damit unterhalb der Werte, die in der Literatur für diese Methode der Synchronisation maximal bei 70-80% liegen (Moreno *et al.*, 1989). Werden synchrone Zellen durch Zentrifugation mittels eines Elutriators aus einer heterogenen Kultur isoliert, so teilen sich 30 % - 40 % der Zellen bei Ablauf des Zyklus synchron (Aves *et al.*, 1985). Im Vergleich zur Literatur kann somit davon ausgegangen werden, daß der Anteil der synchronisierten Zellen in diesem Experiment im Mittel liegt und ausreicht, um eventuelle Konzentrationschwankungen von Prp4p während eines Zellzyklus beobachten zu können.



**Abb. 3.25** Nachweis der HA-Prp4p-Konzentration über den Ablauf eines Zellzyklus mittels Western-Blot-Analyse. Unterhalb des Films ist die Zeit der Probenentnahme nach Inkubation der Zellen bei 36 °C angegeben. K, Kontrollprobe der Zellen vor Beginn der Inkubation bei 36 °C. Nach Entfernung des HA-Antikörpers wurde die Nitrocellulose mit TAT1-Antikörper, der an  $\alpha$ -Tubulin bindet, reinkubiert. Die molare Masse der Marker-Proteine ist in Kilodalton rechts neben der Abbildung angegeben. Die Gesamtproteinkonzentration im SDS-Gel betrug 8  $\mu$ g pro Slot.

In Abb. 3.25 ist das Ergebnis der Western-Blot-Analyse dargestellt. Die Konzentration von  $\alpha$ -Tubulin ist konstant in allen Zellzyklusphasen. Daher wurde  $\alpha$ -Tubulin als interner Standard für diesen Versuch gewählt. Um signifikante Veränderungen in der Prp4p-Konzentration messen zu können, wurden die Bandenintensitäten von Prp4p mit den Bandenintensitäten von  $\alpha$ -Tubulin in jeder Probe verglichen. Wie aus Abb. 3.25 zu ersehen, liegt Prp4p und  $\alpha$ -Tubulin zu allen Zeitpunkten im gleichen Verhältnis vor. Daraus ist zu schließen, daß die Konzentration von Prp4p ebenso wie  $\alpha$ -Tubulin konstant in allen Zellzyklusphasen ist.

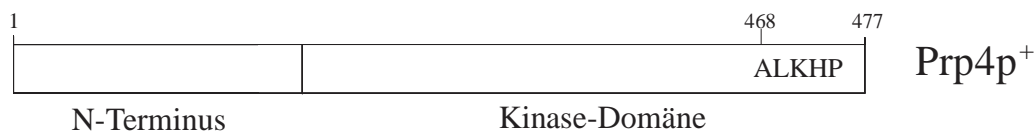
Auch die Wiederholung dieses Versuchsansatzes durch Arretierung der Zellen mit der temperatursensitiven Zellzyklusmutante *cdc25-22* ergab ebenfalls keine Schwankungen in der Prp4p Konzentration während Ablauf eines Zellzyklus (Ergebnisse nicht gezeigt). Die *cdc25-22<sup>ts</sup>*-Mutante verursacht bei der restriktiven Temperatur einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase (Booher *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1989). Der Ablauf des Zyklus wurde ebenfalls durch das Zählen der Zellen und

Bestimmung des Anteils der septierten Zellen und anschließender Western-Blot-Analyse der Proteine verfolgt.

Beide Versuche lassen den Schluß zu, daß in jeder Zellzyklusphase eine bestimmte Konzentration von Prp4p vorhanden ist. Darüberhinaus kann keine Aussage über die Aktivität der Kinase in den Zellzyklusphasen getroffen werden.

### 3.3.2 Eine Dreifach-Mutation im ALKHP-Motiv komplementiert nicht das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel

Der Vergleich der Sequenz von Prp4p mit anderen Kinasen ergab, daß ALKHP in der C-terminalen Kinasedomäne hoch konserviert in Sequenz und Position in CDK's (Cyclin dependent kinases) und MAPK'S (mitogen activated protein kinases) ist (Richert *et al.*, 2002) (Tab.3.6). ALKHP befindet sich in Subdomäne XI der Prp4p-Kinasedomäne (Abb. 3.26; Prp4p-Sequenz Anhang Kap. 7.1.1).



**Abb. 3.26** Schematische Darstellung von Prp4p<sup>+</sup>. Die konservierte Sequenz ALKHP beginnt mit Aminosäureposition 468 in der C-terminalen Kinasedomäne.

Um zu untersuchen, ob dieses Motiv für die Funktion von Prp4p eine Rolle spielt, wurde diese Sequenz durch gezielte Mutationen durch Einfach-, Doppel-, Dreifach-, und Vierfachmutationen verändert (Material und Methoden Kap. 5.11). Die mutierten Konstrukte wurden in den Vektor pRHA42S\* unter der Kontrolle des thiaminregulierbaren *nmt41* Promotors in einen Stamm, der das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel trug, transformiert und das Wachstumsverhalten bei der restriktiven Temperatur getestet (Tab. 3.7, 36 °C).

**Tab. 3.6** Konserviertes Motiv in Subdomäne XI in drei phylogenetischen Gruppen von Kinasen (Richert *et al.*, 2002).

Organismus	Protein	Aminosäureposition	Motiv	GenBank acc no.
CLK`s				
Sp	Prp4	468	ALKHP	L10739
Mm	Clk1	457	ALKHP	X57186
Mm	Clk2	473	ALQHP	P49760
Mm	Clk3	466	ALLHP	P49761
CDK`s				
Sp	Cdc2	287	ALQQN	M12912
Mm	Cdk1	281	ALKHP	M38724
Hs	Cdk2	280	ALAHP	M68520
MAPK`S				
Sp	Spk1	320	ALKHP	Y57334
Sc	Kss1	306	ALRHP	M26398
Dm	ErkA	319	ALAHP	M95124
Hs	Erk2	307	ALAHP	JQ1400
andere				
Sc	Ste20	865	LLHDE	U11581
Sc	Npr1	736	IMEDP	X56084

CLK, CDC2-like kinase; CDK, cyclin dependent kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*, Dm, *Drosophila melanogaster*.

**Tab. 3.7.** Komplementation von *prp4-73<sup>ts</sup>* durch Mutationskonstrukte der Prp4p

Kinasedomäne bei 36 °C.

Genotyp	Plasmid	Wachstum	bei 36°C
Allel	Allel	- Thiamin	+ Thiamin
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>		- - -	- - -
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - A L K H P	+ + +	+ + +
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - S L K H P	+ + +	+ + +
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - S S K H P	+ + +	+ + +
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - A L K L A	+ + +	+ + +
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - S S K L P	- - -	- - -
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - S S K L A	- - -	- - -
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - L L K D E	+ + +	+ + +
<i>prp4-73<sup>ts</sup></i>	pRHA42S* <i>prp4</i> - I M K E P	+ + +	+ + +

Die Einfach-, und Doppelmutationen im ALKHP-Motiv haben keinen Einfluß auf die Funktion der Kinase. Die Konstrukte *prp4*-SLKHP, *prp4*-SSKHP und *prp4*-ALKLA sind in der Lage die *prp4-73<sup>ts</sup>*-Mutation bei 36 °C zu komplementieren (Tab. 3.7).

Hingegen konnten die Konstrukte mit der Dreifachmutation (*prp4*-SSKLP) und der Vierfachmutation (*prp4*- SSKLA) das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel weder unter reprimierten (+Thiamin) noch unter dereprimierten (-Thiamin) Bedingungen komplementieren.

Eine Prp4p Kinase in der ALKHP durch LLKDE bzw. IMKEP ersetzt wurde, komplementiert die *prp4-73<sup>ts</sup>* Mutation bei 36 °C (Tab. 3.7).

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß strukturelle Eigenschaften in dieser Region entscheidend für die Funktion der Kinase sind, weniger die spezifische Aminosäure.

### 3.3.3 Isolierung eines High-Copy-Suppressors von der Prp4p Proteinkinase

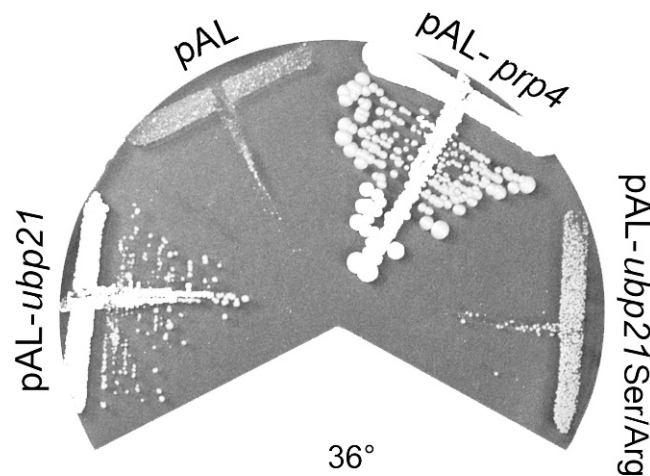
In den letzten Jahren wurde mehrfach versucht High-Copy-Suppressoren der Prp4p-Kinase zu isolieren. Hierzu wurde ein Stamm, der das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel trug, mit einer genomischen *S. pombe*-Genbank transformiert und nach wachsenden Kolonien bei 36°C gesucht. Es konnte jedoch kein High-Copy-Suppressor isoliert werden. Alle Plasmide, die aus den Zellen isoliert wurden, die bei 36 °C wachsen konnten, enthielten das *prp4<sup>+</sup>* Gen (Käufer, N. F., persönliche Mitteilung).

Es wurde nun mit einem *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm, in den das *prp4*-SSKLP-Konstrukt (Dreifachmutation, Tab. 3.7) integriert wurde, nach High-Copy-Suppressoren gesucht (Material und Methoden Kap. 5.5.1). Der Stamm wurde mit einer *S. pombe*-Genombank, deren Fragmente im Vektor pAL ligiert waren (Material und Methoden Kap. 5.6), transformiert und bei 36 °C inkubiert. Nach 10 Tagen konnten große und kleine Kolonien beobachtet werden. Die großen Kolonien bestanden aus Zellen, die von Wildtypzellen morphologisch nicht zu unterscheiden waren. Hingegen waren in den kleinen Kolonien teilweise verlängerte und deformierte Zellen zu finden.

Aus 16 großen Kolonien wurden Plasmide isoliert und deren Insertionen partiell sequenziert. Alle enthielten *prp4*.

Von den Plasmiden aus 16 kleinen Kolonien waren 5 Insertionen identisch. Nur Plasmide mit dieser Insertion waren in der Lage nach Retransformation in den *prp4-73<sup>ts</sup> prp4*-SSKLP-Stamm wieder kleine Kolonien zu produzieren (Abb. 3.27 pAL-*ubp21*). Die Sequenzierung der Insertionen ergab ein offenes Leseraster, wobei die abgeleitete Aminosäuresequenz aus 1129 Aminosäuren besteht.

Der Vergleich dieser Aminosäuresequenz mit der Datenbank führte zur Einordnung dieses Proteins in die Familie der Ubp`s (Ubiquitin-specific processing proteases). Deshalb wurde das Gen mit *ubp21* bezeichnet. Die Familie der Ubp`s besitzen eine stark konservierte Cys-, und His-Domäne, die das aktive Zentrum dieser Proteasen bilden (Hochstrasser, 1996). *S. pombe* besitzt insgesamt 14 Ubp`s (Richert *et al.*, 2002).



**Abb. 3.27** Die Überexpression von *ubp21* supprimiert partiell das *prp4*-SSKLP-Allel. Die angegebenen Plasmide wurden in einen *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm, in dem das *prp4*-SSKLP-Konstrukt integriert vorliegt, bei 25 °C retransformiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 36 °C inkubiert.

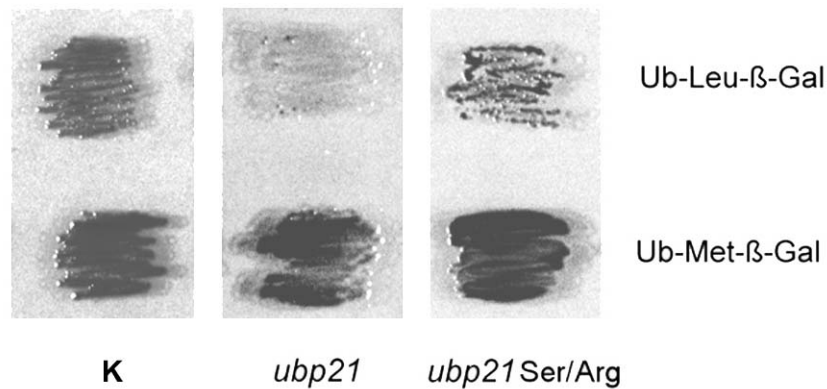
### 3.3.4 Ubp21p ist ein aktives Deubiquitinierungsenzym

Um zu untersuchen, ob Ubp21p Deubiquitinierungsaktivität besitzt, wurde ein Aktivitätstest in Bakterien durchgeführt. Hierzu wurde *ubp21* in einen Bakterienvektor (pQE32, Material und Methoden Kap. 5.5.5) kloniert und mit einem Vektor kotransformiert, der das Substratprotein Ub-Leu- $\beta$ -Galactosidase bzw. Ub-Met- $\beta$ -Galactosidase (Material und Methoden Kap. 5.12) exprimiert.

Die Substratproteine sind Fusionsproteine aus Ubiquitin (Ub) und  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal), zwischen denen ein Leucin (Leu) oder ein Methionin (Met) eingeführt wurde. Wenn Ubp21p Deubiquitinierungsaktivität besitzt, führt dies nach Expression der Substratproteine zur Abspaltung des Ubiquitins und damit zur Bildung von Leu- $\beta$ -Gal, einer instabilen Galactosidase oder zur Bildung von Met- $\beta$ -Gal, eines stabilen Enzyms. Zellen, die das instabile Enzym (Leu- $\beta$ -Gal) exprimieren, bilden nach

Zugabe des Substrats X-Gal weiße Kolonien. Im Gegensatz dazu bilden Zellen, die das stabile Enzym (Met- $\beta$ -Gal) exprimieren, blaue Kolonien (Hochstrasser, persönliche Mitteilung; Varshavsky, 1996).

Die Koexpression ergab, daß die Zellen, die mit *ubp21* und mit Ub-Leu- $\beta$ -Gal-Konstrukt transformiert wurden, weiße Kolonien bildeten und die Zellen, die mit *ubp21* und dem Ub-Met- $\beta$ -Gal-Konstrukt transformiert wurden, blaue Kolonien bildeten (Abb. 3.28). Daraus ist zu schließen, daß Ubp21p Deubiquitinierungsaktivität besitzt.

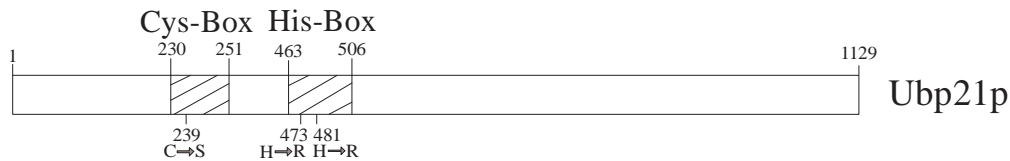


**Abb. 3.28** Test der Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p in Bakterien. *ubp21* und das *ubp21*-Ser/Arg wurden in die Bakterienvektoren pQE32 bzw. pQE31 kloniert. Die Substrate (Ub-Leu- $\beta$ -Gal, Ub-Met- $\beta$ -Gal) befanden sich auf dem Vektor pACYC184 (Material und Methoden Kap. 5.5.7). Die Plasmide wurden wie in der Abbildung dargestellt in Bakterien kotransformiert. K, Kontrolle enthält nur die Substratvektoren. Leu- $\beta$ -Gal ist eine instabile  $\beta$ -Galaktosidase und Met- $\beta$ -Gal ist eine stabile  $\beta$ -Galaktosidase.

Um zu untersuchen, ob die Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p abhängig von der Cys-, und His-Box ist, wurde das konservierte Cystein an Position 239 in der Cys-Box gegen ein Serin und die Histidine an Position 473 und 481 in der His-Box gegen Arginine ausgetauscht (Abb. 3.29; Ubp21p-Sequenz Anhang Kap. 7.1.2). Das Konstrukt mit diesen Mutationen (Material und Methoden Kap. 5.11) wurde als *ubp21*Ser/Arg bezeichnet. Zur Untersuchung der Deubiquitinierungsaktivität wurde



*ubp21Ser/Arg* in den Vektor pQE31 kloniert und mit den auf Seite 50 beschriebenen Substratkonstrukten zur Proteinexpression in Bakterien kotransformiert.



**Abb. 3.29** Schematisch Darstellung des Ubp21-Proteins. Oberhalb des Schemas sind die Cys-, und His-Box mit den Positionen im Protein angegeben. Unter dem Schema sind die Aminosäuren der Wildtypsequenz (C, Cystein; H, Histidin) und die in der Ubp21pSer/Arg-Mutante vorhandenen Aminosäuren (S, Serin; R, Arginin) an Position 239, 473 und 481 in der Cys-, und His-Box angegeben (Richert *et al.*, 2002)

Die Expression von *ubp21Ser/Arg* mit Ub-Leu- $\beta$ -Gal führte zur Bildung von blauen Kolonien. Die Färbung der Kolonien weist daraufhin, daß das Ubiquitin nicht vom Substratprotein abgespalten wurde. Ubp21pSer/Arg zeigt keine Deubiquitinierungsaktivität (Abb. 3.28).

Um zu untersuchen, ob die Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p benötigt wird, um das *prp4*-SSKLP-Allel zu supprimieren, wurde getestet, ob die Expression des *ubp21Ser/Arg*-Konstrukts im *prp4-73<sup>ts</sup>* *prp4*-SSKLP-Stamm bei 36 °C zum Wachstum der Zellen führt.

Wie in Abb. 3.27 (Seite 50) zu sehen ist, wachsen die Zellen bei 36 °C nicht zu Kolonien heran. pAL-*ubp21Ser/Arg* ist nicht in der Lage *prp4*-SSKLP zu supprimieren.

Dies läßt vermuten, daß die partielle Suppression des *prp4*-SSKLP-Allels durch die Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p bedingt wird.

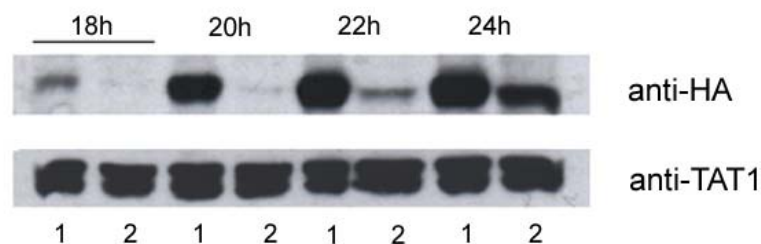
### 3.3.5 Prp4p-SSKLP ist instabiler als Prp4p<sup>+</sup>

Um das Protein Prp4p-SSKLP zu charakterisieren, wurde aus pRHA42S\*-*prp4*-SSKLP und pRHA42S\*-*prp4*-ALKHP (Tab. 3.7) das *ars1* Element des Vektors

entfernt. Diese Konstrukte wurden jeweils durch homologe Rekombination über das *ura4<sup>+</sup>* Gen des Vektors in den *ura4-294*-Locus eines *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes integriert (Material und Methoden Kap. 5.5.1). Beide Gene der Konstrukte stehen unter der Kontrolle des *nmt41*-Promotors.

Die Stämme wurden in thiaminhaltigem Medium bei 25 °C inkubiert, bis die Zellen die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dann wurden die Zellen jeweils unter dereprimierenden Bedingungen ( - Thiamin) für 28h bei 25 °C inkubiert.

Nach 18h Inkubation wurde von jedem Stamm jeweils im 2 Stunden-Abstand eine Probe entnommen. Die Proteine wurden extrahiert und von jeder Probe die gleiche Gesamtproteinkonzentrationen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Der Nachweis von HA-Prp4p-SSKLP und HA-Prp4p erfolgte durch Inkubation mit HA-Antikörpern (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30** Nachweis der Konzentration von HA-Prp4p-SSKLP im Vergleich zu HA-Prp4p in der Western-Blot-Analyse mit HA-Antikörpern. Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin mit TAT1-Antikörper. Die Inkubationszeit der Proben bei 25°C unter dereprimierenden Bedingungen (-Thiamin) ist oberhalb der Spuren angegeben. 1, Proteinextrakt des HA-Prp4p-Stammes; 2, Proteinextrakt des HA-Prp4p-SSKLP-Stammes. Die Gesamtproteinkonzentration im SDS-Gel betrug 8  $\mu$ g pro Slot.

Die Western-Blot-Analyse zeigte, daß das HA-Prp4p Protein schon nach 18h Inkubation unter dereprimierenden Bedingungen mit HA-Antikörpern nachzuweisen war (Abb. 3.30). Nach 20h steigt die Konzentration des Proteins nicht mehr an, sondern bleibt konstant. Hingegen ist das HA-Prp4p-SSKLP Protein erst nach 22h

Inkubation nachweisbar (Abb. 3.30). Nach 24h steigt die Konzentration von HA-Prp4p-SSKLP nicht mehr an. Der Vergleich der maximalen Konzentrationen von beiden Proteinen zeigt, daß HA-Prp4p-SSKLP in signifikant geringerer Konzentration vorliegt als HA-Prp4p.

Die Wiederholung der Analyse nach Inkubation der Zellen bei 36 °C unter dereprimierenden Bedingungen zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied der Proteinkonzentrationen, wobei die maximale Konzentration schon nach 14h bzw. nach 16h erreicht war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das Protein HA-Prp4p-SSKLP instabiler ist als das Wildtypprotein HA-Prp4p.

### 3.3.6 Ubp21p stabilisiert Prp4p-SSKLP

Um zu prüfen, ob Ubp21p bei Überexpression das Prp4p-SSKLP stabilisieren kann, wurde das Plasmid pAL-*ubp21* (Material und Methoden Kap. 5.6) in den Stamm *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*-SSKLP transformiert. Als Kontrolle dienten in diesem Experiment die Stämme *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*-SSKLP und *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*<sup>+</sup>.

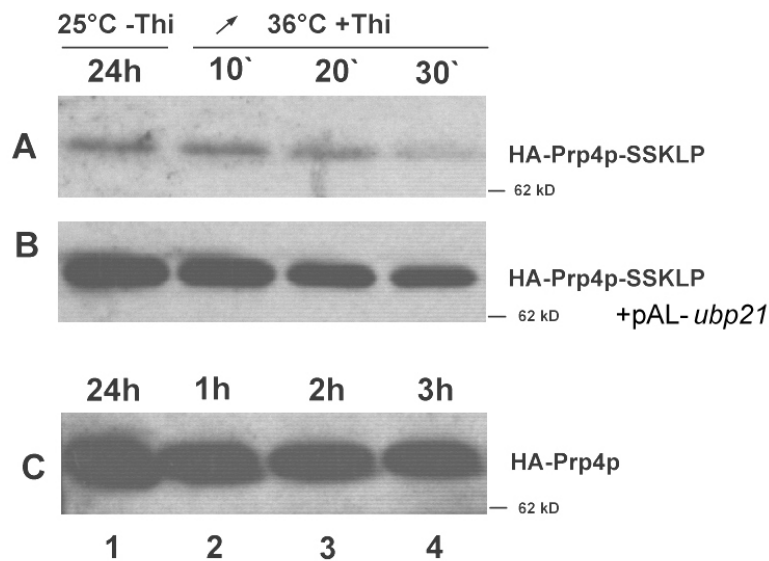
Alle drei Stämme wurden für 24h in Medium ohne Thiamin bei 25 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in thiaminhaltiges Medium umgesetzt und bei 36 °C inkubiert. Vor und auch nach dem Umsetzen in thiaminhaltiges Medium wurden den Kulturen Proben entnommen. Es wurden Proteinextrakte hergestellt und gleiche Gesamtproteinkonzentrationen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Prp4p-SSKLP und Prp4p wurden mit HA-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.31).

Wie die Abbildung 3.31 zeigt, wurde unter dereprimierten Bedingungen bei 25 °C von HA-Prp4p-SSKLP wiederum eine signifikant geringere Proteinkonzentration nachgewiesen als von HA-Prp4p (Abb. 3.31 Spur 1 Zeile A und C).

Die Konzentration von HA-Prp4p-SSKLP nach Überexpression von pAL-*ubp21* in Spur 1 Zeile B ist hingegen wesentlich höher als die Konzentration von HA-Prp4p-SSKLP in Zellen in denen keine Überexpression von *ubp21* erfolgt (Abb. 3.31 Spur 1 Zeile A).

Dies deutet darauf hin, daß HA-Prp4p-SSKLP in diesem Fall von Ubp21p stabilisiert wird.

Die Konzentration von Prp4p-SSKLP nach Überexpression von pAL-*ubp21* ist jedoch im Vergleich immer noch geringer, als die Konzentration von Wildtyp-Prp4p (Abb. 3.31 Spur 1 Zeile B und C). Dies könnte ein Grund für die nur partielle Suppression von *prp4*-SSKLP sein.



**Abb. 3.31** Überexpression von Ubp21p im *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*-SSKLP-Stamm führt zur Stabilisierung von HA-Prp4p-SSKLP. Nachweis der HA-Prp4p-SSKLP-, und HA-Prp4p-Konzentration in der Western-Blot-Analyse mit HA-Antikörpern. Genotypen der verwendeten Stämme: (A) *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*-SSKLP; (B) *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*-SSKLP transformiert mit pAL-*ubp21*; (C) *prp4-73<sup>ts</sup>* HA-*prp4*<sup>+</sup>. Spur 1 Entnahme der Probe nach 24h Inkubation unter dereprimierenden Bedingungen (-Thiamin) bei 25 °C. Spur 2-4 Entnahme der Proben nach Inkubation unter reprimierenden Bedingungen, für Zeile A und B nach 10, 20 und 30 Minuten bei 36 °C; für Zeile C nach 1h, 2h und 3h bei 36 °C. Die Gesamtproteinkonzentration im SDS-Gel betrug 24 µg pro Slot.

Durch Umsetzen der Zellen in Medium mit Thiamin wurde die Expression von HA-Prp4p-SSKLP reprimiert.

Innerhalb von 30 Minuten nimmt die Konzentration von HA-Prp4p-SSKLP stark ab (Abb. 3.31 Zeile A, Spur 2 - 4). In den Zellen, in denen pAL-*ubp21* überexprimiert wurde, konnte eine höhere Konzentration von HA-Prp4-SSKLP innerhalb der ersten 30 Minuten nachgewiesen werden (Abb. 3.31 Zeile B, Spur 2 - 4). Die Konzentration von HA-Prp4p sinkt im Vergleich dazu in sehr geringem Maße und bleibt über 3h relativ stabil (Abb. 3.31 Zeile C, Spur 2 - 4).

Es ist deshalb möglich, daß die Instabilität und das daraus resultierende geringere Gleichgewichtsniveau von Prp4p-SSKLP den Wachstumsdefekt bei 36 °C verursacht und die Überexpression von Ubp21p daher nur zu einer partiellen Suppression führt.

## 4 Zusammenfassende Diskussion

Um den Mechanismus des Spleißvorgangs aufzuklären, wurden viele Proteine durch biochemische Untersuchungen mit *in vitro* Spleißsystemen von Säugetieren und der Knosphefe *S. cerevisiae* charakterisiert (Green, 1986; Padgett *et al.*, 1986; Krainer, & Maniatis, 1985; Lin *et al.*, 1985). Sehr viele Spleißkomponenten wurden auch durch genetische Untersuchungen von konditionalen Prä-mRNA-Spleißmutanten der Hefe vornehmlich der Knosphefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Vijayraghavan *et al.*, 1989; Ruby, & Abelson, 1994).

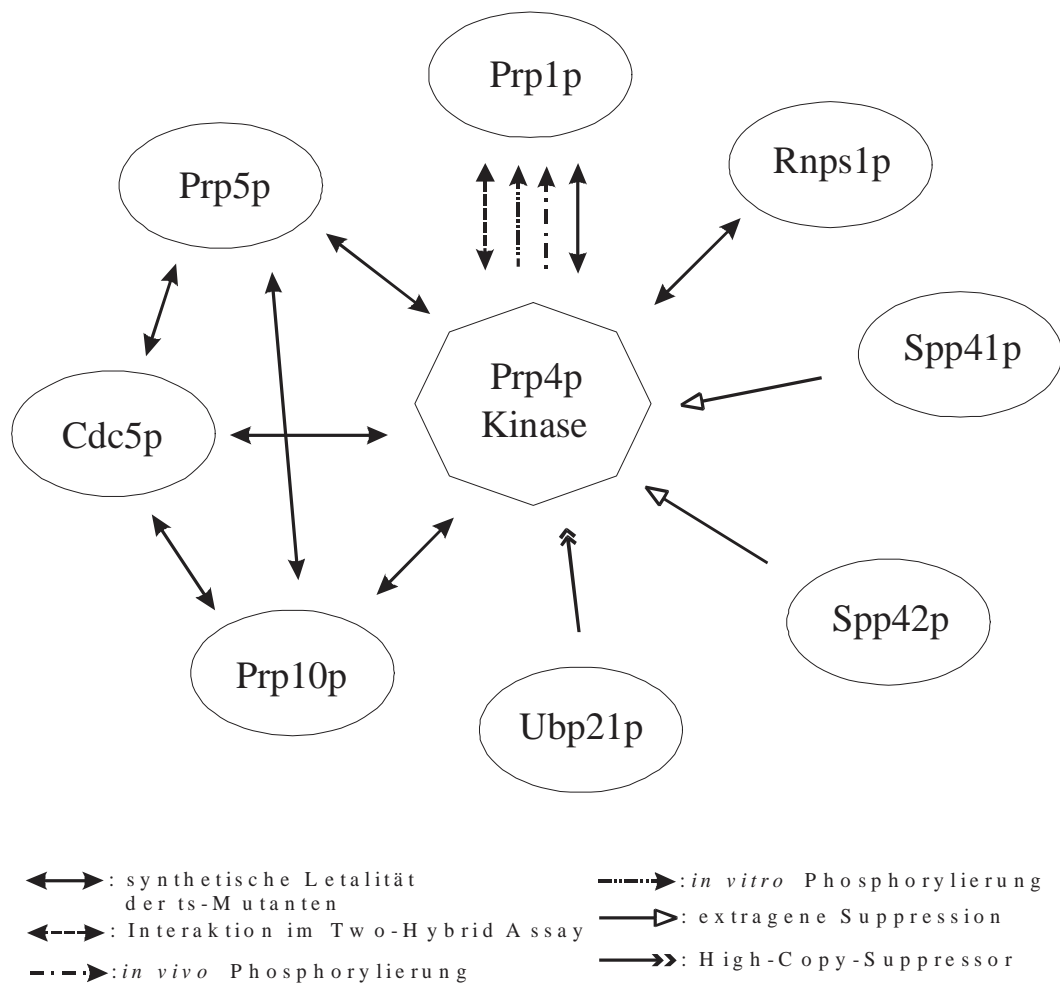
In der Spalthefe wurde die Prp4p-Proteinkinase durch Analyse von Prä-mRNA-Spleißmutanten identifiziert. Sie ist die erste bekannte Kinase, die direkt am Spleißen beteiligt ist. Es ist nachgewiesen, daß die Aktivität von Prp4p *in vivo* essentiell für den Prä-mRNA-Spleißvorgang ist (Schwelnus *et al.*, 2001).

Es konnte keine Kinase mit signifikanter Ähnlichkeit in *S. cerevisiae* identifiziert werden, aber aus Säugerzellen wurde eine Kinase isoliert, die signifikante Ähnlichkeit zu Prp4p aufweist (Kojima *et al.*, 2001).

Die Prp4p Proteinkinase interagiert genetisch mit Cdc5p, Prp5p, Prp1p, Prp10p und Rnps1p (Abb. 4.1). Ebenso wurde ein extragener Suppressor, Spp42p, und ein High-Copy-Suppressor, Ubp21p, der Prp4p Kinase isoliert. Alle sieben Interaktionspartner, außer Ubp21p, wurden in Säugerzellen als bona fide Spleißfaktoren identifiziert (Ajuh *et al.*, 2000; Neubauer *et al.*, 1998; Makarov *et al.*, 2000; Gozani *et al.*, 1998; Mayeda *et al.*, 1999; Lossky *et al.*, 1987).

### 4.1 Die Funktion der Interaktionspartner von Prp4p

Zu diesen Spleißfaktoren aus *S. pombe* existieren homologe Proteine unter anderem in *S. cerevisiae* und im Menschen (Tab. 4.1).



**Abb. 4.1** Schematische Darstellung der Prp4p-Interaktionen. Unterhalb der Abbildung ist die Bedeutung der Pfeile beschrieben.

**Tab. 4.1** Homologe der Prp4p-Interaktionspartner in *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens*.

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Cdc5p	Cef1p	CDC5Lp
Prp5p	Prp46p	PLRG1p
Prp1p	Prp6p	U5-102kDa
Prp10p	Sap155p	SAP155p
Spp42p	Prp8p	U5-220kDa
Rnps1p	—	RNPS1p

RNPS1 wurde als genereller Spleißaktivator im Menschen identifiziert (Mayeda *et al.*, 1999). *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen an Oocyten von *Xenopus laevis* ergaben, daß RNPS1 in einem Komplex aus mehreren Proteinen an die Exon-Exon Grenze gespleißter mRNA gebunden vorliegt, und den Transport der mRNA aus dem Kern in das Cytoplasma stimuliert (Le Hir *et al.*, 2001). Rnps1 aus *S. pombe* ist nicht essentiell für das Wachstum der Hefe. Die Deletion des Gens ist jedoch synthetisch letal mit *prp4-73<sup>ts</sup>* (Abb. 4.1) (Tani, T., persönliche Mitteilung).

Cdc5p und Prp5p interagieren in Säugerzellen direkt miteinander. Die Interaktion erfolgt zwischen dem C-Terminus von Cdc5p und den WD-Domänen von Prp5p (Ajuh *et al.*, 2000). Beide Proteine sind in *S. pombe* Teil eines großen Proteinkomplexes, der als 40S-Komplex bezeichnet wird. In diesem Komplex ist neben verschiedenen Proteinen ebenso die U2-, U5- und U6 snRNA enthalten (McDonald *et al.*, 1999).

In *S. cerevisiae* ist Cef1p/Cdc5p Teil des 19S-Komplex, der keine snRNPs beinhaltet. Dieser Komplex assoziiert stabil an das Spleißosom - vor oder während der Bildung des aktiven Spleißosoms - das durch Interaktion der U2/U6 snRNA und der U5 snRNA mit der Prä-mRNA gebildet wird (Tsai *et al.*, 1999). Sowohl das Homolog von Prp19p, als auch das Homolog von Prp8p/Spp42p, ist ebenfalls im 40S-Komplex enthalten (McDonald *et al.*, 1999).

Die Zusammensetzung des 40S-Komplexes, in dem nur die U2-, U5- und U6 snRNA enthalten ist, läßt vermuten, daß dieser Komplex erst während und / oder nach der Spleißreaktion im Zellkern zu finden ist (McDonald *et al.*, 1999). Der Nachweis dieser drei snRNAs ist ein Indiz dafür, daß die Aktivierung des Spleißosoms schon durch die Anlagerung des U4/U6•U5 snRNP erfolgt sein muß und die Umlagerungsprozesse des Spleißosoms und der Prä-mRNA abgelaufen sind. Da weder die U1 snRNA noch die U4 snRNA im 40S-Komplex nachzuweisen ist, scheint ihre Bindung an den Komplex relativ schwach zu sein. Die Aufreinigung des Komplexes hat möglicherweise die Ablösung dieser snRNAs verursacht. Es wäre aber auch möglich, daß die U1-, und U4 snRNA schon für einen weiteren Durchlauf der Spleißreaktion wieder verwendet wurden und daher nicht mehr an den Komplex gebunden vorliegen. Beide Möglichkeiten sprechen dafür, daß der 40S-Komplex eher einem Komplex während und/oder nach der Spleißreaktion entspricht.



Cdc5p und Prp5p scheinen neben ihrer Funktion im Spleißvorgang eine wichtige Rolle im Zellzyklus auszuüben. Die konditionalen Mutantenallele weisen unter restriktiven Bedingungen neben einem Defekt im Spleißvorgang einen Zellzyklusdefekt beim Übergang von der G2-Phase zur M-Phase auf (Ohi *et al.*, 1994, Potashkin *et al.*, 1998). Dies weist auf eine Verbindung zwischen Prä-mRNA-Spleißvorgang und Zellzyklus hin. Dabei ist nicht geklärt auf welche Weise beide Prozesse miteinander verbunden sein könnten.

Das Homolog von Prp10p im Menschen ist Teil eines Proteinkomplexes, der am U2 snRNP assoziiert vorliegt und als SF3-Komplex bezeichnet wird (Kramer, 1996; Reed, 1996; Will, & Lührmann, 1997). Die Bindung des U2 snRNPs an den Branchpoint des Introns ist ein essentieller Vorgang für den Prä-mRNA-Spleißprozeß. Der Spleißfaktor U2AF und SAP155/Prp10p unterstützen diese Bindung. U2AF bindet an den Pyrimidintrakt des Introns und interagiert mit SAP155/Prp10p (Gonzani *et al.*, 1998). SAP155/Prp10p bindet zu beiden Seiten des Branchpoints und rekrutiert möglicherweise damit U2 snRNP an seinen Bindungsort (Gonzani *et al.*, 1998).

Die Anlagerung des U1 snRNP an die 5`Spleißstelle und die Bindung des U2 snRNP an den Branchpoint des Introns führen zum Aufbau eines Prä-spleißosoms. Die Erkennung von 5`-, und 3`-Spleißstelle, Branchpoint und Pyrimidintrakt ist eine Voraussetzung für eine Spleißreaktion.

SAP155/Prp10p ist nachweislich nicht nur an der Bildung des Prä-spleißosoms beteiligt, sondern auch während bzw. nach der 1. katalytischen Reaktion des Spleißvorgangs (Wang *et al.*, 1998). Zwei Drittel von SAP155/Prp10p sind ähnlich der regulatorischen Untereinheit A von Phosphatase PP2A (Habara *et al.*, 1998; Ruediger *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß SAP155 während bzw. nach der 1. katalytischen Reaktion phosphoryliert vorliegt (Wang *et al.*, 1998). Möglicherweise interagiert SAP155 mit PP2A und reguliert die Aktivität von PP2A, die für die 2. katalytische Reaktion benötigt wird (Murray, 1999).

Spp42p wurde als klassischer extragener Suppressor der Prp4p Kinase isoliert (Abb. 4.1) (Schmidt *et al.*, 1999). Es handelt sich hierbei um ein evolutionär stark konserviertes Protein, das wichtige Funktionen am aktiven Zentrum des Spleißosoms erfüllt. Spp42p/Prp8 ist ein Bestandteil des U5 snRNPs. U5 snRNP bildet einen

Komplex mit U4/U6 snRNP, der als tri-snRNP an das Präspliceosom angelagert wird. Die Anlagerung bewirkt die Umlagerung der Spleißosomkomponenten und damit die Aktivierung des Spleißosoms (Collins, & Guthrie, 1999; Kuhn, & Brow, 2000). Dabei geht Spp42p/Prp8p vor der ersten katalytischen Reaktion Interaktionen mit der 5'-Spleißstelle und nach der ersten katalytischen Reaktion Interaktionen mit der 3'-Spleißstelle ein. Ebenso konnte ein Kontakt mit dem Branchpoint des Introns nachgewiesen werden (MacMillan *et al.*, 1994, Teigelkamp *et al.*, 1995, Umen, & Guthrie, 1995). Alle Ergebnisse lassen darauf schließen, das Spp42p/Prp8p möglicherweise der zentrale Organisator der umfangreichen RNA Umlagerungen während des Spleißvorgangs ist.

Ubp21p wurde als High-Copy-Suppressor der Prp4 Kinase isoliert, der partiell eine Mutation in Prp4p supprimiert (Abb. 4.1). Es handelt sich bei Ubp21p um eins von vierzehn Deubiquitinierungsenzymen von *S. pombe* (Richert *et al.*, 2002).

Die Anheftung von Ubiquitinmolekülen an geschädigte Proteine markiert diese für den Abbau durch das Proteasom (Wilkinson, 2000). Deubiquitinierungsenzyme hingegen spalten Ubiquitin und ermöglichen die Wiederverwertung von Ubiquitin am Proteasom. Außerdem spalten sie Ubiquitinmoleküle von Proteinen ab, um deren gezielten Abbau am Proteasom zu verhindern. Dies schließt auch die Kontrolle über Gleichgewichtsniveaus spezifischer Proteine mit ein (Hochstrasser, 1996; Laney, & Hochstrasser, 1999; Wilkinson, 2000).

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, das Ubp21 die mutierte Kinase stabilisiert. Es ist jedoch möglich, daß Ubp21 auch unter Wildtypbedingungen diese Funktion ausübt. Dies könnte bedeuten, daß das Gleichgewichtsniveau der Prp4p Kinase über den Zellzyklus (Abb. 3.25 Seite 45) durch Ubp21p kontrolliert wird. Dies muß jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### **4.2 Prp1p ist ein physiologisches Substrat der Prp4p Kinase**

Prp1p aus *S. pombe* ist ein Substrat der Prp4p-Kinase *in vivo* (Schwelnus *et al.*, 2001). Es konnte nachgewiesen werden, daß die Prp4p Kinase Prp1p sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* phosphoryliert wird und beide im Two-Hybrid-Assay miteinander

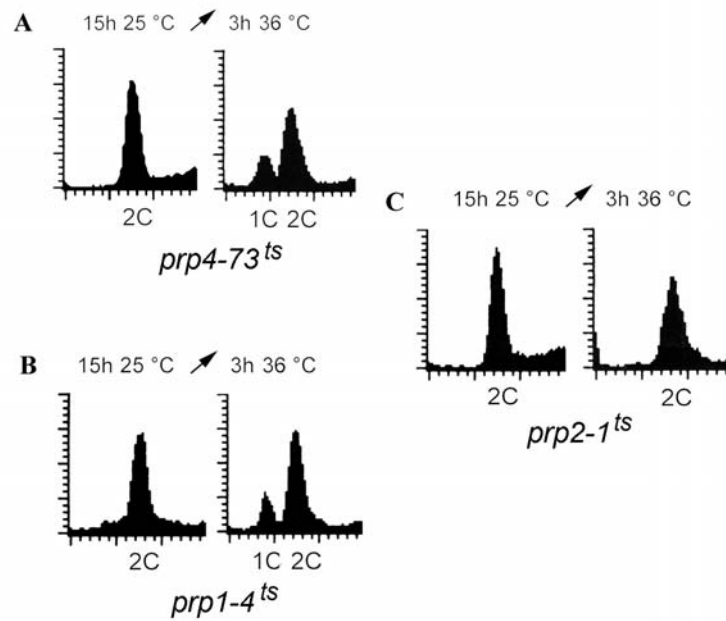
interagieren (Abb. 4.1). Die Inaktivierung der Kinase durch eine Mutation im aktiven Zentrum führt *in vitro* dazu, daß bakteriell produziertes Prp1p nicht phosphoryliert wird (Schwelnus *et al.*, 2001).

Es wurden bisher fünf unterschiedliche Phosphorylierungsstellen im Prp1p *in vitro* identifiziert (Schwelnus, W., persönliche Mitteilung). Welche Stellen *in vivo* phosphoryliert werden, ist noch nicht bekannt.

Prp1p ist ein Spleißfaktor, der in Säugerzellen stabil an U5 snRNP assoziiert und möglicherweise für den Zusammenbau des tri-snRNP bestehend aus U4/U6 snRNP und U5 snRNP verantwortlich ist (Markarov *et al.*, 2000). Prp6p, das Prp1p Homologe in *S. cerevisiae* copräzipitiert mit dem U4/U6 snRNP unter hohen Salzkonzentrationen. Dies deutet daraufhin, daß Prp6p an U4/U6 snRNP assoziiert ist (Abovich *et al.*, 1990). Die Bildung des tri-snRNP ist ein essentieller Schritt bei der Aktivierung des Spleißosoms. Erst durch die Anlagerung des U4/U6•U5-Komplexes lagern sich die Komponenten des Spleißosoms um und bewirken die Annäherung der Exonsequenzen des Introns. Dieses ist eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf der katalytischen Reaktionen. Zur Bildung des tri-snRNPs müssen jedoch die Komponenten zuvor in räumliche Nähe gebracht werden. Prp1p könnte möglicherweise hierbei als Brückenprotein zwischen U5 und U4/U6 snRNP wirken (Makarov *et al.*, 2000).

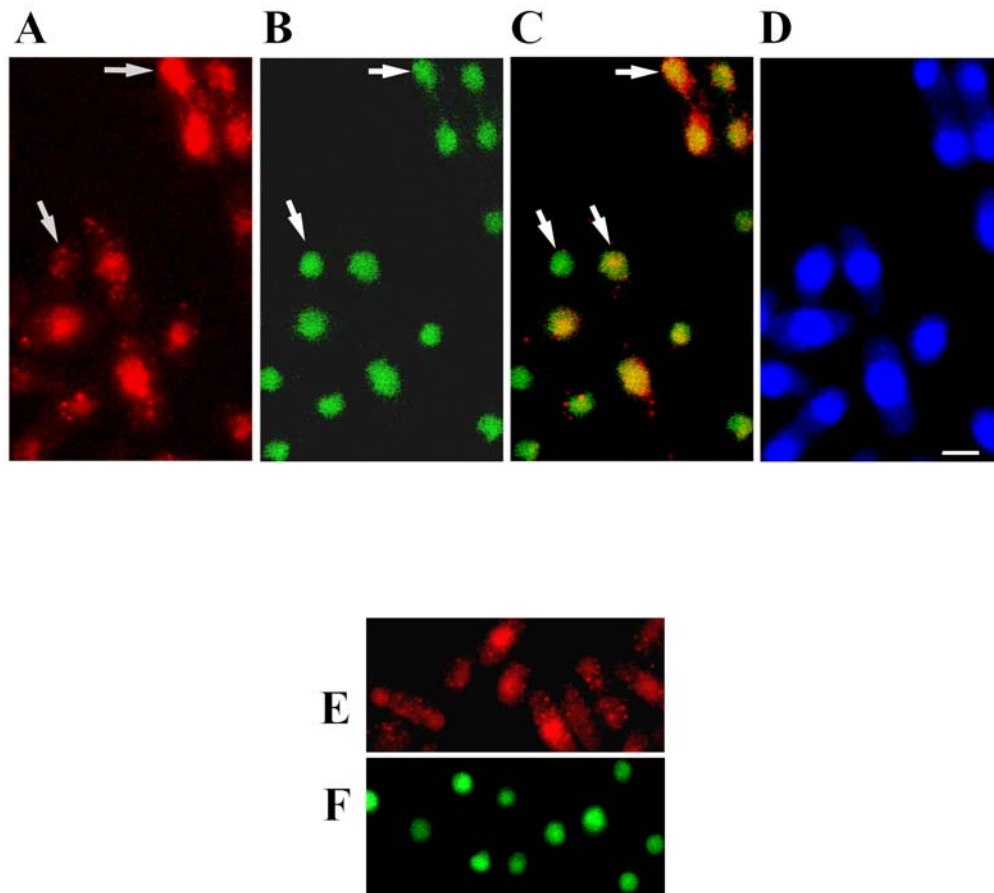
Alle bisher in unserer Arbeitsgruppe erzielten Ergebnisse weisen auf eine direkte Beziehung von Prp4p und Prp1p hin.

Beide ts-Allele, *prp1-4<sup>ts</sup>* und *prp4-73<sup>ts</sup>* zeigen bei der restriktiven Temperatur in der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) den gleichen Phänotyp. Sie sind die einzigen *prp*-Mutanten die eine signifikante Zellpopulation mit einem 1C DNA-Gehalt und eine Population mit einem 2C-DNA-Gehalt aufweisen (Schwelnus *et al.*, 2001) (Abb. 4.2 A und B). Alle anderen *prp*-Mutanten weisen wie *prp2-1<sup>ts</sup>* bei der restriktiven Temperatur nur eine Population mit einem 2C-DNA-Gehalt auf (Abb. 4.2 C). Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, daß sowohl die Aktivität von Prp4p als auch von Prp1p essentiell für den G1-S-, und für den G2-M-Übergang ist.



**Abb. 4.2** FACS-Analyse von *prp4-73<sup>ts</sup>*, *prp1-4<sup>ts</sup>* und *prp2-1<sup>ts</sup>*. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt. (A) *prp4-73<sup>ts</sup>* Stamm nach 15h 25 °C und 3h 36 °C. (B) *prp1-4<sup>ts</sup>* Stamm nach 15h 25 °C und 3h 36 °C. (C) *prp2-1<sup>ts</sup>* Stamm nach 15h 25 °C und 3h 36 °C. Die Peaks (1C, 2C) repräsentieren die Zellen mit charakteristischem DNA-Gehalt für Zellen in der G1-, und G2-Phase.

Um zu untersuchen wo Prp4p und Prp1p in der Zelle lokalisiert sind, wurde GFP-Prp4p gleichzeitig mit HA-Prp1p in einem Wildtyp-*prp4*-Stamm bei 25 °C exprimiert. Hierbei wurde das GFP-*prp4<sup>+</sup>*-Konstrukt unter der Kontrolle eines konstitutiven ribosomalen Proteingenpromotors exprimiert (Material und Methoden Kap. 5.5.2). Das HA-*prp1<sup>+</sup>*-Konstrukt wird unter der Kontrolle des *nmt41*-Promotors exprimiert (Material und Methoden Kap. 5.5.4). Beide Konstrukte liegen integriert im Genom des Wildtyp-*prp4*-Stammes vor. Mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode wurden die getaggten Proteine nachgewiesen (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3** Lokalisation von GFP-Prp4p und HA-Prp1p im Zellkern. (A) Nachweis von HA-Prp1p mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern nach Paraform-/Glutaraldehyd-Fixierung. (B) Nachweis GFP-Prp4p durch Fluoreszenz des GFP nach Paraform-/Glutaraldehyd-Fixierung. (C) Überlagerung des GFP und des HA-Bildes. (D) Nachweis der DNA mit DAPI. (E) *nmt41*-HA-*prp1*<sup>+</sup>-Konstrukt; Nachweis von HA-Prp1p mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern nach P/G-Fixierung. (F) *nmt1*-GFP-*prp4*<sup>+</sup>-Konstrukt; Nachweis von GFP-Prp4p mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern nach P/G-Fixierung. Maßstab im Bild entspricht 5µm.

Wie in Abbildung 4.3 B zu erkennen ist, liegt GFP-Prp4p im Zellkern der Hefe vor. Das Protein ist gleichmäßig über den Kern verteilt. Ebenso ist zu beobachten, daß in allen Zellkernen annähernd die gleiche Menge von GFP-Prp4p vorliegt. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob sich die Zellen momentan teilen, sichtbar durch zwei Kerne innerhalb einer Hefezelle, oder nicht. Die Konzentration an GFP-

Prp4p pro Zellkern scheint in Zellen mit zwei Zellkernen genauso hoch zu sein, wie in Zellen mit einem Zellkern (Abb. 4.3 B Pfeile). Diese Beobachtung wurde mit dem GFP-*prp4*<sup>+</sup> Konstrukt gemacht, das von dem erwähnten ribosomalen Proteingenpromotor (Seite 63 unten) exprimiert wurde.

Auch in Zellen, die ein GFP-Prp4p-Konstrukt unter der Kontrolle des *nmt1*-Promotors ins Genom integriert besitzen (Material und Methoden Kap. 5.5.3), ist die Menge von GFP-Prp4p in jedem Zellkern gleich (Abb. 4.3 F). Es handelt sich somit nicht um ein Artefakt, daß durch die Wahl des Promotors für die Expression des Fusionsproteins verursacht wurde.

Die annähernd gleiche Konzentration an GFP-Prp4p in allen Zellkernen stimmt mit der Beobachtung überein, daß keine Schwankungen in der Prp4p Konzentration über einen Zellzyklus gemessen wurden (Kapitel 3.3.1, Seite 42).

HA-Prp1p liegt ebenfalls im Zellkern der Hefe vor. Hingegen scheint das Protein im Vergleich zu GFP-Prp4p heterogen im Kern verteilt zu sein (Abb. 4.3 A). Außerdem schwankt die nachgewiesene Menge an HA-Prp1p in den Zellen. So wurde eine starke Fluoreszenz in Zellen sichtbar, die zwei Zellkerne aufweisen. Hingegen schwankte die Fluoreszenz in Zellen mit einem Zellkern von sehr schwach bis stark (Abb. 4.3 A Pfeile). Auch eine Wiederholung der Fixierung mit einem Stamm, der nur das Fusionsprotein HA-Prp1p exprimiert, führte zum gleichen Ergebnis (Material und Methoden Kap. 5.5.1). Auch hier schwankte die Menge von HA-Prp1p in den Zellen. (Abb. 4.3 E).

Die Unterschiede in der nachweisbaren Menge an HA-Prp1p in den verschiedenen Zellen wird besonders deutlich, wenn Bild A und B überlagert werden. Dies ist in Abb. 4.3 C dargestellt. Die Zellen in denen nur eine geringe Menge an HA-Prp1p nachzuweisen ist, sind grün gefärbt vom GFP-Prp4p. Ist die Menge an HA-Prp1p größer, so sind die Zellen gelb bzw. rötlich-grün gefärbt (Abb. 4.3 C Pfeile).

Zusammenfassend betrachtet scheint es, daß die Konzentration an HA-Prp1p während der Kernteilung in der Mitose höher ist, also in Zellen mit zwei Kernen, als in Zellen in denen nur ein Zellkern vorliegt.

Dies müßte nun durch die Bestimmung der Prp1p Konzentration während der verschiedenen Zellzyklusphasen mittels einer Synchronisation der *S. pombe* Zellen genauer untersucht werden.

Bei Untersuchung der *in vivo*-Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p zeigte sich, daß nur ein geringer Anteil des Prp1p in der Zelle phosphoryliert vorliegt (Schwelnus *et al.*, 2001).

In Präzipitationsanalysen müßte geklärt werden, ob Prp1p ausschließlich am Spleißosom assoziiert vorliegt, oder ob vielleicht nur ein Teil der Prp1p-Gesamtproteinmenge am Spleißosom assoziiert ist und ob dieser Prp1p-Anteil während der verschiedenen Zellzyklusphasen schwankt.

### **4.3 Zwei Modelle der Kontrollfunktion von Prp4p im Prä-mRNA-Spleißvorgang**

Alle Interaktionspartner der Prp4p Proteinkinase, die als bona fide Spleißfaktoren identifiziert worden sind, scheinen an Prozessen beteiligt zu sein, die während und / oder nach der Aktivierung des Spleißosoms ablaufen (Kap. 4.1). Möglicherweise deutet dies auf eine Funktion der Prp4p Proteinkinase in diesem Teil des Prä-mRNA Spleißvorgangs hin. Um diese Hypothese zu bestätigen müßten die genetischen Interaktionen von Prp4p mit Cdc5p, Prp5p, Prp10p und Spp42p mit biochemischen Untersuchungen unterstützt werden.

Die Interaktion von Prp4p mit Prp1p wurde in der Arbeitsgruppe ausführlich untersucht. Alle Ergebnisse deuten dabei auf eine direkte Interaktion beider Partner hin.

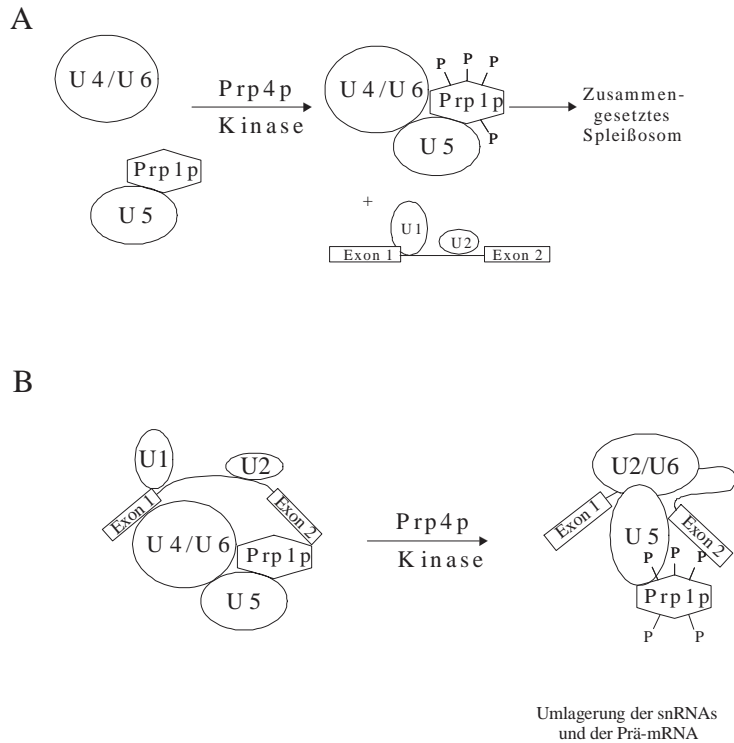
Die vorgestellten Ergebnisse erlauben die Hypothese, daß die Kinaseaktivität von Prp4p die Bildung eines aktiven Spleißosoms durch die Phosphorylierung von Prp1p kontrolliert.

Die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p kann auf zwei Ebenen Einfluß auf diesen Prozeß haben.

Zum Einen kann die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p notwendig sein, um die Zusammenlagerung von U4/U6 snRNP und U5 snRNP zu bewirken. Die Prp4p Kinase würde damit eine Funktion beim Spleißosomaufbau erfüllen (Abb. 4.4 A).

Zum Anderen könnte die Phosphorylierung von Prp1p nach dem Aufbau des Spleißosoms erfolgen. Die Phosphorylierung könnte die Umlagerung der snRNAs und der Prä-mRNA induzieren (Abb. 4.4 B).

In beiden Modellen ist die Kinaseaktivität der Prp4p erforderlich, um durch Phosphorylierung des Prp1p die Voraussetzungen für eine Spleißreaktion zu schaffen.



**Abb. 4.4** Schematische Darstellung zweier Modelle der Funktion von Prp4p im Spleißvorgang. (A) U4/U6•U5 snRNP-Komplexbildung durch Phosphorylierung von Prp1p. (B) Induktion der Umlagerung von snRNAs und Prä-mRNA durch Phosphorylierung von Prp1p. U1, U2, U5, snRNPs; U4/U6 bzw. U2/U6, snRNPs mit basengepaarten snRNAs; Exon1, Exon2 kodierende Sequenzen der Prä-mRNA; Verbindungslinie zwischen Exon1 und Exon2 deutet nichtkodierende Sequenz – Intron – an.



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte

**Tab. 5.1** Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Agarosegelkammer	BRL
Blockthermostat BT 100	Kleinfeldt Labortechnik
Gel-Dokumentation	Phase
Hybridisierungssofen 400 HY	Bachhofer
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan2	Zeiss
Tischzentrifuge	Heraeus
Laborzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Membran-Vakuumpumpe MP18N	Saur
Mikromanipulator Singer MSM System	Singer
Rotoren: SS34, HB4	Sorvall
Spektralphotometer DU-530	Beckmann
Standard Labormikroskop	Zeiss
Taumelgerät Modell 3012	GFL
Thermocycler	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischkühlzentrifuge fresco	Heraeus
Vakuumkonzentrator, SpeedVac plus SC11A	Savant

### 5.2 Chemikalien

**Tab. 5.2** Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
$\alpha$ [ <sup>32</sup> P]dCTP, 370 Mbq/mL, 110TBq/mmol	Hartmann
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth
Adenin	Roth
Agar	BRL
Agarose	Biomol
Ampicillin	Sigma
APS	Roth
Arginin	Roth
Biotin	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA	Merck
Calciumpantothenat	Merck

*Fortsetzung nächste Seite*

Chemikalien	Hersteller
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
DAPI	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DTT	Sigma
EDTA	Roth
dNTPs	Eurogentec
Ethidiumbromid	Biomol
Ethanol	Chemikalienlager TU/BS
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Merck
Hefe-Extrakt	BRL
Histidin	Roth
IPTG	PeqLab
Lambda-DNA (HindIII geschnitten)	BRL
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Merck
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Merck
Natrimborhydrid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Nicotinsäure	Roth
Nucleobond Plasmid Midi Kit	Machery & Nagel
Nucleotrap Gel Extraction Kit	Machery & Nagel
Nylonmembran	Qiagen
Nitrocellulosemembran	Qiagen
Para-Formaldehyd	Merck
Para-Phenylendiamin	Sigma
PEG 4000	Roth
Pepton 140	BRL
Phenol	Roth
Phenol/Chlorof./Isoamylalk. (50:48:2)	Roth
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Natriumdodecylsulfat	Roth
TEMED	Roth
Triton X-100	Roth
Uracil	Roth
X-Gal	PeqLab

## 5.3 Medien

### *S. pombe*:

EMM	Edinburgh minimal medium; als festes und als flüssiges Medium
MMA	minimal medium agar
D-MMA	Selektionsmedium für diploide <i>S.pombe</i> Zellen
MML	minimal medium liquid
YEA	yeast extract agar
YEL	yeast extract liquid
MEA	malt extrakt agar
SPA	Medium zur Herstellung von diploiden <i>S.pombe</i> Zellen

Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Egel (1971), Gutz *et al.* (1974) und Moreno *et al.* (1991) beschrieben. Für auxotrophe Stämme wurde dem Medium nach Bedarf folgende Supplemente zugefügt:

Adenin	75 mg/L
Arginin	100 mg/L
Histidin	100 mg/L
Leucin	150 mg/L
Lysin	50 mg/L
Uracil	100 mg/L
Thiamin	0,002 mM

### *E. coli*:

LB	als festes und als flüssiges Medium
----	-------------------------------------

Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Zur Selektion von Plasmiden wurden dem Medium folgende Antibiotika zugefügt:

Ampicillin	40 mg/L
Chloramphenicol	30 mg/L
Tetracyclin	15 mg/L

Zur  $\alpha$ -Komplementierung wurde auf dem Medium, wenn nicht anders angegeben, 100  $\mu$ L IPTG (0,1 M) und 50  $\mu$ L X-Gal (20 mg/L in Dimethylformamid) ausplattiert.

## 5.4 Stämme

### 5.4.1 *S. pombe* Stämme

In Tab. 5.3 sind die Hefestämme nach Themen des Ergebnisteils und Diskussionsteils geordnet aufgeführt, die für diese Arbeit hergestellt oder verwendet worden sind. Die vorhandenen Stämme wurden der Stammsammlung des Instituts für Genetik der TU Braunschweig entnommen und leiten sich nach den von Leupold (1950) beschriebenen Kulturen ab.

Der jeweilige Paarungstyp des Stammes ist angegeben ( $h^{90}$ ,  $h^{+N}$ ,  $h^{-S}$ ). Die Mutationen sind durch die Allelbezeichnung beschrieben. Die Integration von Vektoren in das Genom der Hefe ist durch die vorrangestellte Bezeichnung „int:“ gekennzeichnet.

**Tab. 5.3** Verwendete *S. pombe* Stämme geordnet nach den Themen im Ergebnis-, und im Diskussionsteil.

Stammbezeichnung	Genotyp
allgemein	
L 968	$h^{90}$ (Wildtyp)
L 972	$h^{-S}$ (Wildtyp)
L 975	$h^{+N}$ (Wildtyp)
Genetische Interaktionen	
SL 11	$h^{-S}$ <i>ura4-294 prp4-73<sup>ts</sup></i>
HE 676	$h^{+N}$ <i>leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup></i>
UR 105	$h^{-S}$ <i>prp1-4<sup>ts</sup></i>
SL 127	$h^{-S}$ <i>zer1-C5<sup>ts</sup></i>
HE 623	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-294 prp1-116<sup>ts</sup></i>
UR 230	$h^{-S}$ <i>prp10-1<sup>ts</sup></i>
SL 145	$h^{-S}$ <i>prp5-1<sup>ts</sup></i>
SL 146	$h^{+N}$ <i>prp5-1<sup>ts</sup></i>
SL 129	$h^{+N}$ <i>cdc5-120<sup>ts</sup></i>
SL 130	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-294 ade6-M210 cdc5-120<sup>ts</sup></i>
SP 968	$h^{+N}$ <i>leu1-32 cdc28-P8<sup>ts</sup></i>
extragene Suppressoren	
HE622	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-D18</i>
CS1	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-D18-prp4-73<sup>ts</sup> spp42-1</i>
CS2	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> spp41-1</i>
CS3	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> spp41-1</i>
HE 300	$h^{+N}$ <i>leu1-32</i>
HE 691	$h^{+N}$ <i>leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> spp42-1</i>
HE 692	$h^{+N}$ <i>leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> spp41-1</i>
SL 28	$h^{+N}$ <i>lys1 ade4-31 prp4-73<sup>ts</sup> swi5-39</i>
SL 30	$h^{-S}$ <i>ade6-M210 prp4-73<sup>ts</sup> spp42-1 swi5-39</i>
SL 31	$h^{-S}$ <i>ade6-M210 prp4-73<sup>ts</sup> spp41-2 swi5-39</i>
SL 41	$h^{+N}$ <i>ura1-171 his6-365 prp4-73<sup>ts</sup> swi5-39</i>
SL 42	$h^{-S}$ <i>prp4-73<sup>ts</sup> spp42-1 swi5-39</i>
SL44	$h^{+N}$ <i>lys1 prp4-73<sup>ts</sup> swi5-39</i>
KR 1	$h^{-S}$ <i>prp4-73<sup>ts</sup> spp41-2 swi5-39</i>
KR 2	$h^{-S}$ <i>his6-365 prp4-73<sup>ts</sup> spp42-1</i>
KR 3	$h^{+N}$ <i>arg3-124 prp4-73<sup>ts</sup></i>
KR 4	$h^{-S}$ <i>his6-365 prp4-73<sup>ts</sup> spp41-2</i>
SL 7	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 prp4-73<sup>ts</sup> spp42-1</i>
SL 9	$h^{-S}$ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 prp4-73<sup>ts</sup> spp41-2</i>
HE 677	$h^{+N}$ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 prp4-73<sup>ts</sup></i>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Stammbezeichnung	Genotyp
High-Copy-Suppressor	
AG 6	<i>h<sup>+</sup><sup>N</sup> leu1-32 ura4-294</i>
AG 16	<i>h<sup>-</sup><sup>S</sup> leu1-32 cdc10-129<sup>ts</sup> ura4-294 int::pRIPHAprp4<sup>+</sup></i>
St. 129	<i>h<sup>-</sup><sup>S</sup> ura4-294 int::pRIPHAprp4-ALKHP prp4-73<sup>ts</sup></i>
St. 173	<i>h<sup>+</sup><sup>N</sup> ura4-294 int::pRIPHAprp4-SSKLP prp4-73<sup>ts</sup></i>
St. 162	<i>h<sup>+</sup><sup>N</sup> leu1-32 ura4-294 int::pTG13prp4-SSKLP prp4-73<sup>ts</sup></i>
Fluoreszenzmikroskopie	
St. 36	<i>h<sup>-</sup><sup>S</sup> ura4-294 int::pTG13prp4<sup>+</sup></i>
St. 256	<i>h<sup>-</sup><sup>S</sup> leu1-32 ura4-294 int::pRIPHAprp1<sup>+</sup></i>
St. 261	<i>h<sup>-</sup><sup>S</sup> leu1-32 int::pJK148nmt41HAprp1<sup>+</sup> ura4-294 int::pTG8prp4<sup>+</sup></i>

### 5.4.2 *E. coli* Stämme

Die in Tab. 5.4 aufgeführten Stämme wurden für Transformationen, Vermehrung von Plasmid-DNA und als Wirt für den Bakteriophagen M13mp18 verwendet.

**Tab. 5.4** Verwendete *E. coli* Stämme

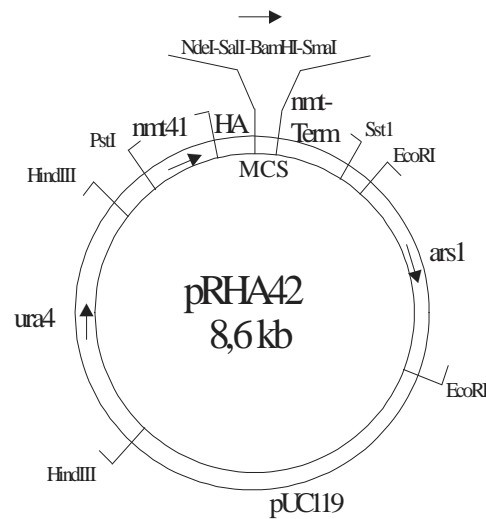
Stammbezeichnung	Genotyp
DH5α <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> $\phi$ 80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF) ΔlacU196 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1
CJ236	dut1 ung1 thi-1 relA1 [pCJ105(Cam <sup>r</sup> )] F <sup>-</sup> [cat=(pCJ105;M13sCam <sup>r</sup> )]
XL1-Blue	hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 λ <sup>-</sup> lac F <sup>-</sup> [proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet <sup>r</sup> )]

## 5.5 Vektoren

### 5.5.1 pRHA/pRIPHA42

Der Shuttlevektor pRHA42 bzw. pRIPHA42 wurde zur Expression von HA-Fusionsproteinen (HA = Hemagglutinin Epitop des Human Influenza Virus), in denen HA C-terminal fusioniert ist, in der Hefe verwendet (Abb. 5.1). Zur Replikation in *S. pombe* dient das *arsI* Element von *S. pombe*. Im pRIPHA42 ist dieses Element deletiert (*EcoRI* Fragment). Der Vektor kann durch homologe Rekombination in den *ura4* Locus des *S. pombe* Genoms integriert werden (Bähler *et al.*, 1998). Dies wurde durch Linearisierung des Vektors mit einem Restriktionsenzym im *ura4<sup>+</sup>* Gen ermöglicht. In der pUC 119 Sequenz ist der ColE1 Origin sowie das β-Lactamase Gen (Ampicillinresistenz) enthalten, wodurch eine Vermehrung und Selektion in *E. coli* durchgeführt werden kann. Der Vektor enthält den *nmt41* Promotor, der durch

Zugabe von Thiamin zum Medium reprimiert werden kann und den Terminator des *nmt1* Gens aus *S. pombe*. Es handelt sich hierbei um den „mittelstarken“ *nmt* Promotor, der durch eine Mutation in der TATA-Box eine geringere Transkriptionseffizienz aufweist (Basi *et al.*, 1993).



**Abb. 5.1** Schematische Darstellung des Vektors pRHA42 (Basi *et al.*, 1993). *nmt41*, *nmt41* Promotor; *nmt-Term*, *nmt1* Terminator; *ars1*, *arsI* Element von *S. pombe*; HA, Hemagglutinin Eptop des Human Influenza Virus; pUC119, Teile des *E. coli* Vektors pUC119; MCS, Multiple Cloning Site.

#### Konstrukte für:

##### Regulation der Prp4p Kinaseaktivität über den Zellzyklus? (Kap. 3.3.1)

Das Konstrukt pRHA42S\**prp4*<sup>+</sup> stammt aus der Konstruktsammlung der Arbeitsgruppe Käufer, Institut für Genetik, und wurde von Dr. Thomas Groß hergestellt. Dafür wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion und Primern, die am Start-, und Stopcodon der *prp4* cDNA (*prp4* Gen GenBank acc. no. L10739) binden, der gesamte offene Leserahmen der cDNA amplifiziert. Das 1,4 kb große PCR-Fragment wurde dann in den pRHA42S\* kloniert, der in der Multiple Cloning Site eine aufgefüllte *SalI*-Schnittstelle besitzt.

Dieses Konstrukt wurde für die Integration in das Genom der Hefe zur Zellzyklusarretierung verändert. Das *ars1*-Element des Vektors wurde durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* herausgeschnitten und der Vektor religiert. Zur Integration in das *S. pombe* Genom wurde das Konstrukt mit *StuI* im *ura4*<sup>+</sup> Gen des Vektors linearisiert und durch homologe Rekombination in die *ura4-294* Marke des Stammes integriert. Zur Arretierung der Zellen wurde *cdc10-129*<sup>ts</sup> in den Stamm eingekreuzt.

##### Eine Dreifach-Mutation im ALKHP-Motiv komplementiert nicht das *prp4-73*<sup>ts</sup>-Allel (Kap. 3.3.2)

Die Konstrukte mit den Mutationen für diesen Versuch wurden durch gerichtete Mutagenese der *prp4*<sup>+</sup> cDNA (*prp4* Gen GenBank acc. no. L10739) von Dr. Thomas

Groß, Institut für Genetik, hergestellt (Kap. 5.11). Die mutierten Konstrukte wurden dann in die *Bam*HI-Schnittstelle des pRHA42S\* (S\*, aufgefüllte *Sal*I-Schnittstelle) kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte in einen *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stamm transformiert.

#### Prp4p-SSKLP ist instabiler als Prp4p<sup>+</sup> (Kap. 3.3.5)

Das pRHA42S\**prp4*-SSKLP Konstrukt (siehe Seite 74 unten) wurde nach Entfernung des *arsI*-Elements (*Eco*RI-Fragment) durch Linearisierung im *ura4<sup>+</sup>* Gen des Vektors in *ura4-294* eines *prp4-73<sup>ts</sup>*-Stammes integriert.

#### Immunfluoreszenzmikroskopie (Kap. 4.2)

Das HA-*prp1<sup>+</sup>*-Konstrukt für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurde durch Klonierung der cDNA des *prp1<sup>+</sup>* Gens (*prp1* Gen GenBank acc. no. AB019219) in die *Sal*I-Schnittstelle des Vektors pRHA42 hergestellt. Hierzu wurde der gesamte offene Leserahmen mit Hilfe einer PCR-Reaktion und Primern, die am Start-, und hinter dem Stoppcodon der cDNA binden und *Sal*I-Restriktionschnittstelle besitzen, amplifiziert (2,7 kb Fragment) (hergestellt von Dr. Thomas Groß, Arbeitsgruppe Käufer, Institut für Genetik).

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde aus diesem Konstrukt das *arsI* Element (*Eco*RI-Fragment) entfernt und der Vektor religiert (pRIPHA42*prp1<sup>+</sup>*). Die Integration des Konstrukts in die *ura4-294*-Marke eines *prp4<sup>+</sup>*-Stammes erfolgte nach der Linearisierung des Vektors im *ura4<sup>+</sup>* Gen durch das Restriktionsenzym *Stu*I.

### **5.5.2 pTG8**

Der pTG8-Vektor ist ein Shuttelvektor, der zur Expression von GFP-Fusionsproteinen (GFP, Green Fluorescent Protein), in denen GFP N-terminal fusioniert ist, in *S. pombe* eingesetzt wurde (Groß, T., persönliche Mitteilung) (Abb. 5.2). Für die Expression in der Hefe enthält der Vektor den konstitutiven ribosomalen KD4 Promotor. Die Selektion in der Hefe erfolgt über das *ura4<sup>+</sup>* Gen von *S. pombe*. In der pUC19 Sequenz ist der *ColE1* und das  $\beta$ -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz) enthalten, die eine Vermehrung und eine Selektion des Vektors in *E. coli* ermöglicht.

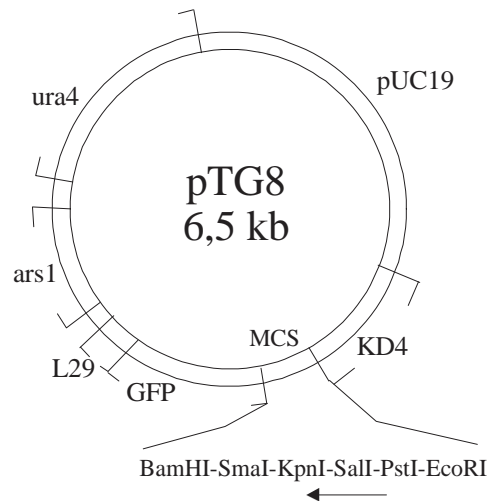
#### Konstrukte für:

#### Immunfluoreszenzmikroskopie (Kap. 4.2)

Das GFP-*prp4<sup>+</sup>*-Konstrukt für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde durch Klonierung der cDNA von *prp4<sup>+</sup>* (*prp4* Gen GenBank acc. no. L10739) in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pTG8 hergestellt. Mit Hilfe einer PCR-Reaktion und Primern, die am Start-, und Stoppcodon der *prp4* cDNA binden und Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI besitzen, wurde hierfür der gesamte offene Leserahmen der cDNA amplifiziert. Dieses Konstrukt stammt aus der Sammlung der Arbeitsgruppe Käufer des Instituts für Genetik und wurde von Dr. Thomas Groß hergestellt.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde das *arsI* Element entfernt (*Cla*I-

Fragment) und der Vektor religiert. Die Integration des Konstrukts in die *ura4-294* Marke des Hefestammes erfolgte nach Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsenzym *StuI* im *ura4<sup>+</sup>* Gen des Vektors.



**Abb. 5.2** Schematische Darstellung des Vektors pTG8. KD4, konstitutiver ribosomaler KD4-Promotor von *S. pombe*; GFP, Green Fluorescent Protein; T129, Terminator des ribosomalen Proteingens L29/2; *ura4*, *ura4<sup>+</sup>* Gen von *S. pombe*; *arsI*, *arsI* Element von *S. pombe*; pUC19, Teile des *E. coli* Vektors pUC19; MCS, Multiple Cloning Site.

### 5.5.3 pTG13

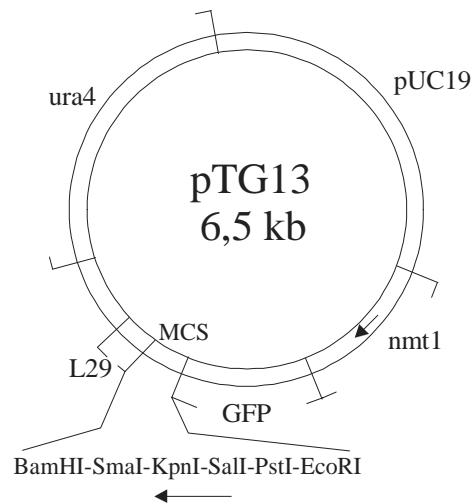
Der Shuttelvektor pTG13 wurde zur Expression von GFP-Fusionsproteinen (GFP, Green Fluorescent Protein), in denen GFP C-terminal fusioniert ist, in der Hefe eingesetzt und ist geeignet für die Integration in den *ura4* Locus von *S. pombe* (Groß, T., persönliche Mitteilung) (Abb. 5.3). Zur Expression enthält der Vektor den *nmt1* Promotor und den T129 Terminator des ribosomalen Proteingens L29/2. Die Selektion in der Hefe erfolgte über das *ura4<sup>+</sup>* Gen aus *S. pombe*. Die pUC19 Sequenz enthält den ColE1 und das  $\beta$ -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz) zur Vermehrung und Selektion des Vektors in *E. coli*.

#### Konstrukte für:

##### Immunfluoreszenzmikroskopie (Kap. 4.2)

Das GFP-*prp4*-Konstrukt für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde durch Klonierung der *prp4* cDNA in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pTG13 hergestellt (Beschreibung cDNA siehe Kap. 5.5.2). Mit dem Restriktionsenzym *StuI* wurde das Konstrukt im *ura4<sup>+</sup>* Gens des Vektors linearisiert und durch homologe Rekombination in die *ura4-294*-Marke des Hefestamms integriert.

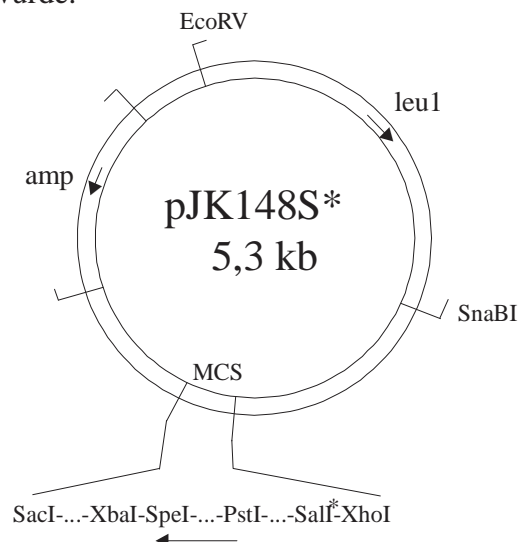




**Abb. 5.3** Schematische Darstellung des pTG13 Vektors. *nmt1*, *nmt1* Promotor; GFP, Green Fluorescent Protein; L29, Terminator des ribosomalen Proteingens L29/2; *ura4*, *ura4*<sup>+</sup> Gen von *S. pombe*; pUC19, Teile des *E. coli* Vektors pUC19; MCS, Multiple Cloning Site.

#### 5.5.4 pJK148S\*

Für die Integration in den *leu1* Locus von *S. pombe* wurde der Shuttelvektor pJK148S\* verwendet (Abb. 5.4) (Keeney, & Boeke, 1994). Der Vektor enthält das *leu1*<sup>+</sup> Gen von *S. pombe*. Außerdem enthält der Vektor zur Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Gen, den Replikationsursprung ColE1 und das *lacZ*<sup>-</sup> Gen, das in einem geeigneten *E. coli* Stamm Blau/Weiß-Selektion ( $\alpha$ -Komplementierung) ermöglicht. Die Bezeichnung S\* zeigt an, daß die *SalI* Restriktionsschnittstelle in der Multiple Cloning Site zerstört wurde.



**Abb. 5.4** Schematische Darstellung des Vektors pJK148S\*. *leu1*, *leu1*<sup>+</sup> Gen aus *S. pombe*; amp, Ampicillinresistenz; MCS, Multiple Cloning Site; *SalI*<sup>\*</sup>, *SalI* Site ist zerstört.

## Konstrukte für:

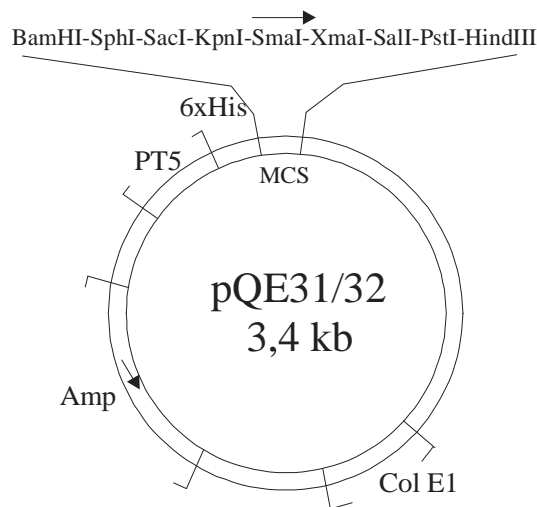
### Immunfluoreszenzmikroskopie (Kap. 4.2)

Zur Herstellung des HA-*prp1*<sup>+</sup>-Konstrukts für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde in die Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Sac*I (*Sst*I) des Vektors pJK148S\* der *nmt41*-Promotor, die HA-Sequenz, die Multiple Cloning Site und der *nmt*-Terminator als Kassette aus dem Vektor pRHA42 umklont.

Der gesamte offene Leserahmen des *prp1*<sup>+</sup> Gens wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion und Primern, die am Start-, und hinter dem Stoppcodon binden und die *Sal*I-Restriktionsschnittstelle besitzen, amplifiziert und in pRHA42 kloniert (hergestellt von Dr. Thomas Groß, Arbeitsgruppe Käufer, Institut für Genetik).

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde aus diesem Konstrukt *prp1*<sup>+</sup> mit *Sal*I herausgeschnitten (2,7 kb) und vom Vektor abgetrennt. Das *prp1*<sup>+</sup> Fragment wurde anschließend in den pJK148S\*-HA-*nmt41* in die *Sal*I-Schnittstelle des MCS aus pRHA42 (Kassette) umklont. Die Integration des Konstrukts in das Genom der Hefe erfolgte nach der Linearisierung des Vektors im *leu1*<sup>+</sup> Gen durch das Restriktionsenzym *Sun*I.

### 5.5.5 pQE31/32



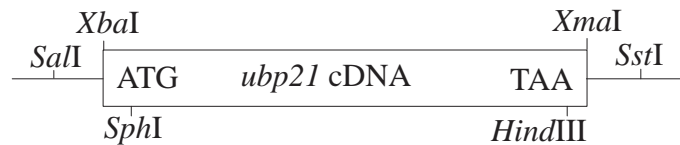
**Abb. 5.5** Schematische Darstellung des Vektors pQE31 bzw. pQE32. PT5, PT5 Promotor; Amp, Ampicillinresistenzgen; ColE1, Replikationsursprung; MCS, Multiple Cloning Site.

Der Expressionvektor pQE31 bzw. pQE32 wurde zur Expression von His-Fusionsproteinen in *E. coli* eingesetzt (Abb. 5.5) (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990 a und b). Die Vektoren sind ein Produkt der Firma Qiagen. Zur Selektion in *E. coli* trägt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Die pQE-Serie ermöglicht die Expression unterschiedlicher Leseraster. Die unterschiedlichen Leseraster werden durch die Vektorseriennummer angedeutet.

Konstrukte für:

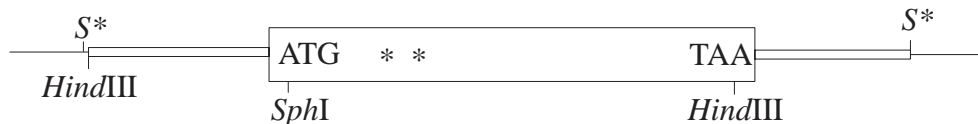
Ubp21p ist ein aktives Deubiquitinierungsenzym (Kap. 3.3.4)

pQE32*ubp21* ist entstanden durch die Umklonierung des *Sal*I-ATG→TAA-*Sst*I-Fragments der *ubp21* cDNA aus dem Konstrukt pUC19*ubp21*-*Xba*I/*Xma*I (3,5 kb, Abb. 5.6) (*ubp21* Gen, GenBank acc. no. CAC22603) in die *Xba*I-, und *Xma*I-Restriktionsschnittstelle von pQE32 (Abb. 5.5.5). Die cDNA wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion und Primern, die am Start-, und am Stoppcodon binden und zum einen die *Xba*I-, (am ATG) und zum anderen die *Xma*I-Restriktionsschnittstellen (am TAA) enthalten, amplifiziert und in den pUC19 kloniert (Hersteller Dr. Thomas Groß, Institut für Genetik).



**Abb. 5.6** Schematische Darstellung des Konstrukts pUC19*ubp21*-*Xba*I/*Xma*I.

Das *ubp21*Ser/Arg-Konstrukt wurde durch Umklonierung des *Sph*I-*Hind*III-Fragments (3,0 kb) aus pAL18*ubp21*Ser/Arg (Abb. 5.7) in die Restriktionsschnittstellen *Sph*I und *Hind*III des Vektors pQE31 (Abb.5.5) hergestellt.



**Abb. 5.7** Schematische Darstellung des Konstrukts pAL18*ubp21*Ser/Arg. Mit \* ist die Lage der Mutationen im *ubp21* angegeben (Lage nicht Maßstabs getreu).

### 5.5.6 pREP3

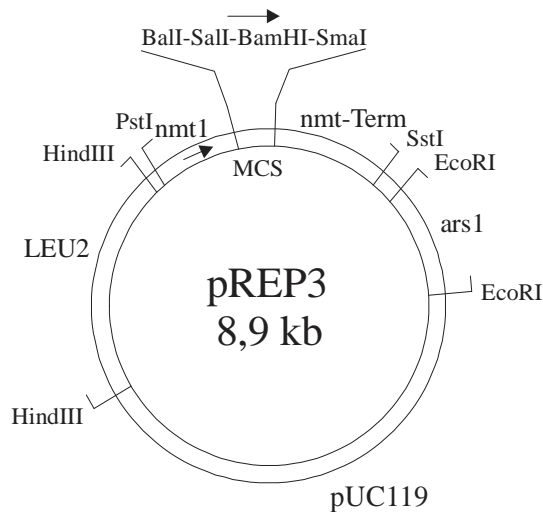
Für die Expression von Genen in *S. pombe* wurde der Vektor pREP3 verwendet (Maundrell, 1993) (Abb. 5.8). Dieser Vektor enthält den Promotor und den Terminator des *nmt1* Gens von *S. pombe* (Maundrell *et al.*, 1993). Zur Replikation in *S. pombe* dient das *ars1* Element von *S. pombe*. Für die Selektion in der Hefe enthält der Vektor das *LEU2* Gen von *S. cerevisiae*. Zur Vermehrung des Vektors in *E. coli* enthält er außerdem Teile des Plasmids pUC119, in dem ebenso ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion enthalten ist.

Konstrukte für:

Identifizierung der Suppressoren (Kap. 3.2.6):

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion wurde aus chromosomaler DNA der gesamte offene Leserahmen des *spp42* Gens (*spp42* Gen, GenBank acc. no. Z98530) mit Primern,

die am Start-, und hinter dem Stoppcodon binden und die *BalI* und *XmaI*-Restriktionsschnittstelle besitzen, amplifiziert. Die Aufreinigung und Klonierung des PCR-Fragments ist in Kap. 5.7.10 beschrieben.



**Abb. 5.8** Schematische Darstellung des Vektors pREP3. *nmt1*, *nmt1* Promotor von *S. pombe*; *nmt-Term*, Terminator des *nmt1* Promotors von *S. pombe*; *ars1*, *ars1* Element von *S. pombe*; pUC119, Teile des Plasmids pUC119; LEU2, *LEU2* Gen von *S. cerevisiae*; MCS, Multiple Cloning Site.

### 5.5.7 pACYC184

Dieser Bakterienvektor ist ein Produkt der Firma Biolabs. Der Vektor enthält ein Tetracyclinresistenzgen und ein Chloramphenicolresistenzgen zur Selektion in Bakterien.

Konstrukte für:

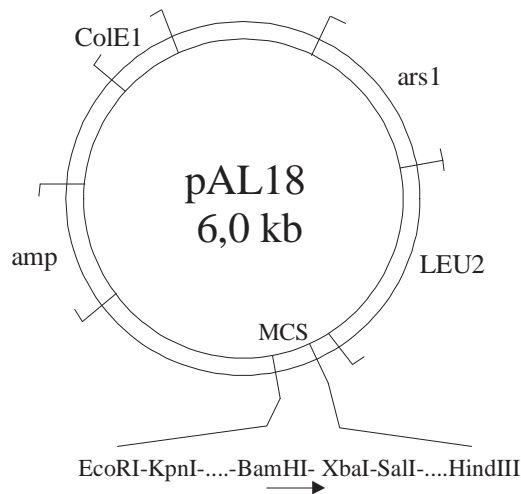
Ubp21p ist ein aktives Deubiquitinierungsenzym (Kap. 3.3.4)

Der Vektor wurde im Deubiquitinierungsaktivitätstest zur Expression des Substratproteins (Ub-Leu- $\beta$ -Gal oder Ub-Met- $\beta$ -Gal) eingesetzt. Die Substratplasmide wurden von Dr. M. Hochstrasser (Yale University, USA) zur Verfügung gestellt.

### 5.6 *S. pombe* Genbank

Das *ubp21* Gen wurde aus einer genomischen *S. pombe* Bank (Barbet *et al.*, 1992) isoliert. Die Bank wurde aus chromosomaler *S. pombe* DNA hergestellt, die partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten worden ist. Die Enden wurden durch eine Klenow-Polymerase-Reaktion partiell aufgefüllt. Die Fragmente wurden in die partiell aufgefüllte *SalI* Schnittstelle des Vektors pAL18 ligiert (Abb. 5.9). Der Shuttlevektor pAL18 ist aus dem Vektor pUR18 hervorgegangen.

(<http://pingu.salk.edu/~forsburg/images/pUR18>). Der Vektor enthält das *LEU2* Gen von *S. cerevisiae* und das *ars1* Element aus *S. pombe*. Zur Selektion in *E. coli* dient ein Ampicillinresistenzgen. Die Bank enthält ca. 116000 unabhängige Klone. Die Inserts besitzen eine durchschnittliche Länge von 3,3 kb.

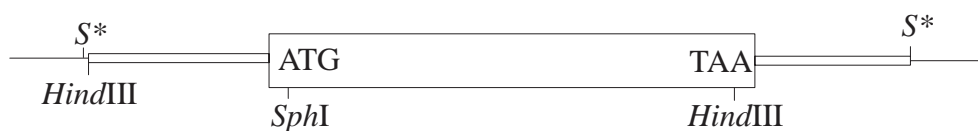


**Abb. 5.9** Schematische Darstellung des Vektors pAL18 (Carr, A., persönliche Mitteilung). *LEU2*, *LEU2* Gen von *S. cerevisiae*; *ars1*, *ars1* Element aus *S. pombe*; *amp*, Ampicillinresistenzgen; *ColE1*, Replikationsursprung *E.coli*; MCS, Multiple Cloning Site.

Konstrukte für:

Isolierung eines High-Copy-Suppressors von der Prp4p Proteinkinase (Kap. 3.3.3):

Aus der genomischen *S. pombe* Bank wurde pAL18*ubp21* (Abb. 5.10) mit der gesamten Sequenz des *ubp21*<sup>+</sup> Gens als Suppressor des *prp4*-SSKLP-Allels der Prp4p Proteinkinase isoliert. Dieses Plasmid wurde zur Retransformation in den Stamm *prp4-73*<sup>ts</sup> *prp4*-SSKLP verwendet.



**Abb. 5.10** Schematische Darstellung des Konstrukts pAL18*ubp21*.

Ubp21p stabilisiert Prp4p-SSKLP (Kap. 3.3.6)

Um zu überprüfen ob Ubp21p bei Überexpression das Prp4p-SSKLP Protein stabilisieren kann, wurde der *prp4-73*<sup>ts</sup> *prp4*-SSKLP-Stamm mit pAL18*ubp21* (Abb. 5.10) transformiert. Das *ubp21*-Insert (*S\** - *S\**) ist 5,8 kb groß. pAL18*ubp21* wurde aus der pAL18-Klonbank als Suppressor des *prp4*-SSKLP Allels der Prp4p Kinase isoliert.

## 5.7 Standard DNA-Methoden

### 5.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte nach der Methode von Brown *et al.* (1975). Hierzu wurden kompetente *E. coli* Zellen nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode hergestellt. Dafür wurden 100 mL Medium mit 1 mL stationärer *E. coli* Vorkultur angeimpft und solange bei 37 °C inkubiert bis die Kultur eine OD von 0,3 – 0,4 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann bei 4 °C 10 Minuten bei 3500 Upm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in insgesamt 40 mL eiskalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (0,1 M) vorsichtig resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei 3500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in insgesamt 20 mL 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  Lösung mit 15 % Glycerin suspendiert. Die Zellen wurden anschließend in 500 µL Aliquots bei – 80°C eingefroren.

Für die Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. 200 µL der Zellen wurden dann mit der zu transformierenden wässrigen DNA-Lösung gemischt und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und dann mit 1 mL Medium versetzt. Der Ansatz wurde dann 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nun wurden die *E. coli* Zellen für 5 Minuten bei 2500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf den entsprechenden Antibiotika-Selektionsmediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 5.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### Plasmid-Minipräparation (abgewandelt nach Gaterman *et al.*, 1993)

Die *E. coli* Zellen einer 2 mL Übernachtskultur wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in der Restflüssigkeit resuspendiert. Zum Pellet wurden 110 µL STET-Puffer (8 % Saccharose (w/v), 5 % Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 0,5 mg/mL Lysozym) dazugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden dann 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend in einem Wasserbad bei 90 °C für 2 Minuten erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz bei 13000 Upm für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 110 µL Isopropanol gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in  $\text{H}_2\text{O}$  Bidest. aufgenommen und bei – 20 °C gelagert.

#### Plasmid-Midipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* bis zu 100 µg wurde das Kit Nucleobond AX100 von Machery & Nagel verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### 5.7.3 Transformation von *S. pombe*

Die Transformation von *S. pombe* Zellen wurden nach einer abgewandelten LiAc-Methode nach Okazaki *et al.* (1990) durchgeführt. Hierzu wurden 100 mL eines Minimalmediums mit einer exponentiell wachsenden *S. pombe* Vorkultur auf eine OD von 0,06 – 0,08 angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD von 0,6 – 0,8 geerntet (3000 Upm, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 mL LiAc (0,3 M) in TE resuspendiert und für 1 Stunde bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde die Suspension gelegentlich aufgeschüttelt.

Für die Transformation wurden jeweils 100 µL Zellen in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und mit 10 µL Kalbsthymus-DNA (10 mg/mL) vermischt. Für die Transformation von Plasmiden wurden 0,5 – 2,0 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Integration von Plasmiden in das Genom von *S. pombe* wurden bis zu 10 µg der zuvor mit Restriktionsenzymen linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt.

Der Ansatz wurde für 45 Minuten bei RT inkubiert und gelegentlich aufgeschüttelt. Dann wurde den Zellen 1 mL 40 % (w/v) PEG-4000 zugegeben, vorsichtig umgeschüttelt und für weitere 45 Minuten bei RT inkubiert. Dabei wurde auch hier gelegentlich umgeschüttelt, damit sich die Zellen nicht am Boden absetzten. Anschließend wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und dann 5 Minuten bei 2500 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 2500 Upm für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf entsprechendem Minimalmedium ausplattiert und für mehrere Tage bei 25 °C bzw. 30 °C inkubiert.

### 5.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pombe*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pombe* wurde in abgewandelter Form nach Hoffmann, & Winston (1987) durchgeführt. Hierzu wurden 10 mL Vollmedium mit *S. pombe* Zellen angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (1 Minute bei 13000 Upm) verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurden 200 µL Puffer (2 % (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 0,1 M NaCl, 0,01M Tris-HCl (pH 8,0), 0,001 M EDTA), 200 µL PCIA und 0,3 g Glasperlen zum Pellet gegeben. Der Ansatz wurde für 3 – 4 Minuten gevortext und nochmals mit 200 µL Puffer versetzt. Die Zelltrümmer wurden dann 5 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert und die wäßrige Phase mit PCIA reextrahiert und wiederum für 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit 1 mL 96 % EtOH gefällt. Die Fällung wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µL TE-Puffer und 3 µL RNase A (10 mg/mL) aufgenommen. Der RNase Verdau wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 10 µL 4 M NH<sub>4</sub>-Acetat Lösung und 1 mL 96 % EtOH gefällt. Der Ansatz wurde anschließend



für 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet unter Vakuum getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 30 µL TE-Puffer aufgenommen.

### **5.7.5 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen**

Für die Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Gibco-BRL, MBI Fermentas und New England Biolabs (NEB) verwendet. Plasmid-DNA wurde mit 1 U (Unit) Restriktionsenzym pro µg DNA für 1 Stunde inkubiert. Die Reaktionspuffer und Reaktionstemperaturen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt.

### **5.7.6 Dephosphorylierung von DNA**

Zur Vermeidung von Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligation wurden die 5'-Phosphatreste des Vektor-Fragments mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (CIAP) abgespalten. Hierfür wurden 1 µg des linearisierten Vektors mit 1 U CIAP für 30 – 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde anschließend durch eine PCIA Extraktion inaktiviert und die DNA durch eine EtOH-Fällung präzipitiert.

### **5.7.7 Ligation von DNA**

Zur Ligation von Vektor-, und DNA-Fragment wurde T4-Ligase (BRL) verwendet. Die Ligation erfolgte in einem 20 µL Reaktionsvolumen bei 14,8 °C über Nacht. Der Vektor wurde im Verhältnis 1 : 5 zum Fragment eingesetzt.

### **5.7.8 Klenow-Polymerase Reaktion**

Um die überstehenden Enden von DNA-Fragmenten partiell aufzufüllen, wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (BRL) verwendet. Mit dieser Polymerase können nur 5'-überhängende Enden aufgefüllt werden. Für die Reaktion wurden die DNA-Fragmente für 30 Minuten bei 37 °C mit 1 U pro µg DNA unter Zugabe von 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP inkubiert.

### **5.7.9 Agarose-Gelelektrophorese**

#### Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde die Elektrophorese in 0,7 % - 1,2 % Agarosegelen durchgeführt. Die Fragmente wurden durch Zugabe von 0,5 µg/mL Ethidiumbromid im Gel nachgewiesen. Die Proben wurden mit Lade-Puffer (15% (w/v) Ficoll 400, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 1 – 3 Stunden bei 100 V aufgetrennt. Als Größen-Standard diente mit *EcoRI* und/oder *HindIII*



geschnittene DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  oder ein 1 kb Marker der Firma MBI-Fermentas.

#### Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit Hilfe des Nucleotrap Kits der Firma Machery & Nagel wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. Die Fragmente wurden dabei an Silikapartikel gebunden und mit TE-Puffer eluiert. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **5.7.10 PCR – Polymerase Chain Reaction**

#### Enzyme und Reaktionsbedingungen

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen verwendet: Mit der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene) wurden DNA-Abschnitte amplifiziert, die für die Herstellung von Konstrukten dienten, die in *S. pombe* exprimiert werden sollten. Die *Pfu*-Polymerase hat „proof-reading“ Aktivität und zeichnet sich durch eine besonders geringe Fehlerrate aus. Außerdem wurde zur Amplifizierung von sehr großen DNA-Fragmenten die Herkulase-Polymerase (bis zu 37 kb; Stratagene) verwendet. Auch diese Polymerase hat „proof-reading“ Aktivität. Alle anderen PCR-Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der Pro-HA Polymerase (Eurogentec) durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer wurden von der Firma Metabion oder der Firma Sigma synthetisiert. Die zugesandten lyophilisierten Primer wurden mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 25 pmol/μL eingestellt.

#### PCR-Reaktion zur Isolierung des *spp42*-Suppressors:

Die in Tabelle 5.5 angegebenen Primer enthalten die Restriktionsschnittstellen *BalI* und *XmaI*. Die Sequenz der Primer wurde nach dem ORF in Cosmid SPAC4F8.c12 entwickelt, der unter GenBank accession no. Z98530 gespeichert ist. Das erwartete PCR-Fragment mit diesen Primern hatte eine Größe von 7 kb.

Die Sequenz der Primer ist in Tab. 5.5 aufgelistet und in 5`-3`-Richtung angegeben. Die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen *BalI* und *XmaI* ist unterstrichen. Im *BalI*-Primer ist das ATG des ORF fett geschrieben.

**Tab. 5.5** Verwendete PCR-Primer zur Isolierung des *spp42*-Suppressors.

Bezeichnung	Sequenz
<i>BalI</i> -Primer	5`-CCAT <u>GGCCAT</u> <b>T</b> GGCGTCGTTACCACCGGGGAATCCTCC-3`
<i>XmaI</i> -Primer	5`-GGG <u>CCCGGG</u> AAAACTATAATCTAACGCATAATGTACTT-GATG-3`

Die PCR-Reaktion wurde mit der Expand high fidelity polymerase (Boehringer, Indianapolis) durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 35 Zyklen durchgeführt, wobei die DNA in jedem Zyklus für 30 Sekunden bei 94 °C denaturiert wurde. Die Annealing-Zeit betrug 45 Sekunden und die Synthesezeit 10 min bei 68 °C. Das PCR-Produkt wurde in den *E. coli* Vektor pCR2.1 des TOPO-TA cloning Kits (Invitrogen, San Diego) nach den Angaben des Herstellers kloniert.

### Subklonierung des PCR-Produkts (*spp42*-Suppressor) in den Expressionsvektor pREP3:

Das Plasmid pCR2.1, daß das 7 kb PCR-Fragment enthielt, wurde mit *BalI* und *XmaI* geschnitten, das PCR-Fragment vom Vektor getrennt und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in die *BalI* und *XmaI* (*SmaI*) Schnittstelle des pREP3 subkloniert (pREP3 Kap. 5.5.6). Das Fragment steht damit unter der Kontrolle des thiaminreprimierbaren *nmt1* Promotors (Maundrell *et al.*, 1993).

## **5.8 Standard RNA-Methoden**

### **5.8.1 Isolierung von RNA aus *S. pombe***

Die Isolierung von RNA wurde nach Nischt *et al.* (1986) durchgeführt. Aus einer wachsenden *S. pombe* Kultur wurden 20 mL Zellkultur entnommen und für 10 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und nach der Zentrifugation ( 10 Minuten 5000 Upm) der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann bei – 20 °C eingefroren.

Um die RNA zu isolieren, wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 400 µL LETS-Puffer mit 1 % LiDS ( 0,1 M LiCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 M EDTA, Lithiumsalz in 1 % LiDS) versetzt. Der Ansatz wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit 0,3 g Glasperlen gegeben und fest verschlossen. Der Ansatz wird insgesamt 2 Minuten gevortext und dazwischen alle 20 Sekunden auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz mit 400 µL LETS-Puffer (0,2 % LiDS) gemischt, mit 800 µL PCIA versetzt und gut geschüttelt. Die Proben wurden dann für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und erneut mit 800 µL PCIA extrahiert. Das Zellpellet von der 1. Extraktion wurde mit 800 µL LETS-Puffer mit 0,2 % LiDS re-extrahiert. Nun wurde bei 4 °C 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand aus dem 2. Extraktionsschritt wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 800 µL PCIA extrahiert. Der Überstand aus der Reextraktion der Zellen wurde zur Phenol-Phase vom 2. Extraktionsschritt gegeben. Die Extraktion wurde solange weitergeführt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Dann wurden die Überstände vereinigt und die RNA durch Zugabe von 5 mL EtOH (96%) und 40 µL 5 M LiCl auf Eis gefällt. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 13000 × g in der Kühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 400 µL H<sub>2</sub>O bidest (steril) aufgenommen. Durch die Zugabe von 2 mL 96 % EtOH und 16 µL LiCl wurde die RNA erneut gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet gewaschen und getrocknet.

Die getrocknete RNA wurde in 50 – 100 µL H<sub>2</sub>O bidest. (steril). aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt und auf 3 µg/µL eingestellt.

### 5.8.2 Auftrennung von RNA in Agarosegelen

Die Gesamt-RNA wurde nach Nischt *et al.* (1986) in denaturierenden formaldehydhaltigen Agarosegelen aufgetrennt. Gelbestandteile: 1,125 g Agarose in 62,5 mL H<sub>2</sub>O bidest. mit 750 µL 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 60 °C wurden 6 µL Ethidiumbromid (5 mg/mL) und 12,5 mL Formaldehyd (37 %) zugegeben. Das Gemisch wurde dann in einen Gelträger (14 × 11 cm) gegossen. Das Gel wurde nach dem Erstarren mit Laufpuffer (0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5) überschichtet.

15 µg RNA wurden zum Auftragen mit 15 µL Denaturierungspuffer (250 µL Formamid, 75 µL Formaldehyd (37 %), 5 µL 0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5) und 45 µL H<sub>2</sub>O bidest.) gemischt und für 15 Minuten bei 50 °C im Heizblock denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und mit 5 µL Probenpuffer (3,8 mL Glycerin 87 % (v/v) mit 300 µL 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5) und 25 mg Bromphenolblau) versetzt.

Die RNA wurde bei einer Spannung von 100 V für 4-6 Stunden aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5) verwendet. Der Puffer wurde während der Elektrophorese mit Hilfe einer Pumpe von der Kathode ( - ) zur Anode ( + ) gepumpt, damit der pH-Wert des Puffers stabil bleibt.

### 5.8.3 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Blot)

Der Transfer und die Fixierung von RNA auf eine Membran wird als Northern-Blot bezeichnet. Die RNA wurde hierfür in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt und folgendermaßen auf die Membran übertragen:

Eine Glasplatte wurde auf eine Schale gelegt, in der sich 20 × SSC (3 M NaCl, 0,3 M Trisnatriumcitrat (pH 7,0)) befindet. Auf die Glasplatte wurden zwei Lagen Whatman 1mm Papier gelegt, so daß die Enden des Papiers in die Lösung tauchten. Das Agarosegel wurde auf das Whatmann Papier und die Nylonmembran auf das Gel gelegt. Auf die Membran wurden 3 Lagen mit 20 × SSC getränktes Whatman 3MM Papier, 3 Lagen trockenes 3MM Whatman Papier und mehrere Lagen saugfähiges Papier gelegt. Das Ganze wurde mit einem Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Membran getrocknet und für 2 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank gebacken.

### 5.8.4 Radioaktive Markierung von DNA; Sonde für den Northern-Blot

DNA-Fragmente wurden mit dem Amersham Multiprime DNA Labeling System nach dem Protokoll des Herstellers mit α[<sup>32</sup>P]dCTP markiert. Die Markierung erfolgt nach der Random Priming Methode, bei der Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz an die denaturierte DNA angelagert werden und als Primer für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* dienen. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) von der markierten DNA abgetrennt. Für die Hybridisierung wurde die Sonde für 5 Minuten in einem kochenden Wasserbad denaturiert.

### 5.8.5 Hybridisierung von RNA

Die Nylonmembran mit der fixierten RNA wurde in einer Lösung aus  $6 \times \text{SSC}$ , 0,2 % Ficoll, 0,2 % Polyvinylpyrrolidin, 0,2 % BSA, 1 % SDS und 0,1 mg/mL denaturierter Kalbsthymus-DNA für 3 Stunden im Hybridisierungssofen bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Nylonmembran in eine Lösung aus  $6 \times \text{SSC}$ , 1 % SDS, 0,1 mg/mL Kalbsthymus-DNA, 30 – 50 % Formamid und der radioaktiv markierten DNA-Sonde gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unspezifisch gebundene Sonde wurde dann durch Waschen in  $10 - 0,1 \times \text{SSC}$  mit 0,2 % SDS entfernt. Die Membran wurde anschließend getrocknet und in einer Autoradiographiekassette bei – 80 °C für 1 bis 3 Tage auf einem Röntgenfilm exponiert.

## 5.9 Standard Protein-Methoden

### 5.9.1 Isolierung von Proteinextrakten aus *S.pombe*

Zur Isolierung der Gesamt-Proteine aus *S. pombe* (Moreno *et al.*, 1991) wurden 25 mL einer Zellkultur mit einer OD von 0,8 geerntet und 5 min bei 3000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 mL Stoppuffer (0,15 M NaCl, 0,05 M NaF, 0,01 M EGTA, 0,001 M  $\text{NaN}_3$  mit NaOH auf pH 8) versetzt und in einem 2 mL Reaktionsgefäß für 2 Minuten bei 3500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µL HB-Puffer (0,025 M MOPS mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt, 0,015 M EGTA, 0,015 M  $\text{MgCl}_2$ , 0,06 M  $\beta$ -Glycerophosphate, 0,001 M DTT, 0,0001 M  $\text{NaVO}_3$ ) mit Proteaseinhibitoren (0,0125 g/mL) gelöst. Dem Ansatz wurden Glasperlen bis zum Meniskus des Puffers zugefügt und insgesamt 10 Minuten gevortext, wobei der Ansatz alle 20 Sekunden auf Eis gekühlt wurde. Der Zellaufschluß wurde unter dem Mikroskop überprüft. Der Extrakt wurde  $2 \times$  mit HB-Puffer extrahiert und die Überstände in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Die Überstände wurden dann 15 Minuten bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

### 5.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Verfahren basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G 250 von  $\lambda = 465$  zu  $\lambda = 595$ , wenn der Farbstoff mit den Proteinen Komplexe bildet (Bradford *et al.*, 1976).

Es wurde hierzu eine Standardreihe mit einer BSA-Stammlösung (1mg/mL in HB-Puffer) im Konzentrationsbereich von 1 – 10 µg/mL erstellt. Die Standardproben (Gesamtvolumen HB-Puffer + BSA-Stammlösung 20 µL) wurden hierzu mit 980 µL vom 1 : 5 verdünnten Bradfordreagenz (0,1 M Coomassie brilliant blue G250, 50 mL 96 % EtOH, 100 mL konzentrierte Phosphorsäure, 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.) versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Standardproben wurden dann bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm vermessen. Jeweils 1 – 4 µL der Gesamtproteinextrakte wurden auf die gleiche Weise mit dem Bradfordreagenz versetzt und die Konzentration im

Photometer bestimmt.

### 5.9.3 Auftrennung der Proteine in SDS-Gelen

Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Gel aufgetrennt (Laemmli *et al.*, 1970). Das SDS-Gel bestand aus einem 4 %igem Sammelgel (2,3 mL H<sub>2</sub>O, 0,94 mL 4×Sammelgelpuffer [0,5 M Tris, 0,4 % SDS auf pH 6,8 mit HCl eingestellt], 0,5 mL Acrylamidstammlösung 30 %, 4 µL TEMED, 40 µL APS 10 % w/v) und einem 7,5 %igem Trenngel (4,2 mL H<sub>2</sub>O, 2,1 mL 4×Trenngelpuffer [1,5 M Tris, 0,4 % SDS auf pH 8,8 mit HCl eingestellt], 2,1 mL Acrylamidstammlösung 30 %, 6 µL TEMED, 83 µL APS 10 % w/v). Die Proteine wurden mit 2 × Probenpuffer (0,125 M Tris pH 6,8, 4 % SDS, 4 % β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau) versetzt, auf das Sammelgel aufgetragen und in diesem Gelabschnitt aufkonzentriert. Im Trenngel erfolgte dann die Auftrennung der Proteine. Als Marker wurde der Prestained Protein Marker Broad Range der Firma Biolabs verwendet und als Laufpuffer wurde 1 × Glycinpuffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS) verwendet. Der Lauf im Sammelgel erfolgt bei 100 V, im Trenngel bei 150 V.

### 5.9.4 Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)

Die Übertragung von Proteinen auf eine Membran wird als Western-Blot bezeichnet. Hierzu wurden die Proteine mit einem Elektrophoretogerät der Firma Phase auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Aufbau des Blots wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zeit der Übertragung der Proteine auf die Membran errechnet sich nach der Größe des SDS-Gels bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran bis zur Entwicklung eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

### 5.9.5 Immunonachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran

Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgt mit dem ECL-Kit der Firma Amersham. Die Nitrocellulosemembran wurde hierzu nach den Angaben des Kit-Herstellers nach dem Abblocken mit Blockpuffer (Magermilchpulver 10 % in TBS-Puffer [NaCl 0,137 M, KCl 0,027M, Tris 0,025M auf pH 8 eingestellt]) und mehreren Waschschritten mit einem primären Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde hierzu 1 : 1000 in TBS-Puffer verdünnt und die Membran darin für 1 Stunde inkubiert. Dann wurde die Membran mit TBS-Puffer gewaschen und mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper, der gegen den HA-Antikörper gerichtet ist, für 1 Stunde inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde hierzu 1 : 1500 in TBS-Puffer verdünnt. Die Membran wurde anschließend mehrmals gewaschen und für 2 × 20 Minuten in TBS-Tween (0,05 %) inkubiert. Die Membran wurde dann in der Dunkelkammer mit dem Entwicklungsreagenz, in dem Luminol enthalten ist, entwickelt. Luminol wird von der Peroxidase am sekundären Antikörper in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert und Energie wird als Licht an den Stellen auf der



Membran frei, an denen der sekundäre Antikörper gebunden hat. Das freiwerdende Licht wurde durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films detektiert.

#### Antikörper:

Der primäre HA-Antikörper ist ein monoklonaler Maus Antikörper und wurde von der Firma BabCo bezogen.

Der primäre TAT1-Antikörper ist ein monoklonaler Maus Antikörper und detektiert  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Tubulin. Der Antikörper wurde von Dr. A. Baines (University of Manchester, UK) zur Verfügung gestellt.

Der sekundäre Antikörper ist ein Maus Antikörper aus dem Schaf und ist mit der Merretich-Peroxidase gekoppelt. Der Antikörper ist ein Bestandteil des ECL-Kits der Firma Amersham.

## **5.10 Methoden zur Untersuchung von *S. pombe***

### **5.10.1 Tetradenanalyse**

Um eine Tetradenanalyse durchführen zu können, mußten zwei Stämme mit unterschiedlichen Paarungstyp gekreuzt werden. Hierzu wurden zwei Stämme mit  $h^{+N}$  und  $h^{-S}$ -Paarungstyp auf Vollmedium ausgestrichen und 3 Tage bei 25 °C inkubiert. Wenn die Stämme gut gewachsen waren, wurden 50 µL NaCl Lösung (0,85 %) mit einer dicken Impföse Zellmaterial von beiden Stämmen in einem Reaktionsgefäß angeimpft. Durch Auf-, und Abpipettieren mit einer Gilsonpipette wurden beide Stämme miteinander gemischt und auf Malzextraktagar (MEA) aufgetropft. Wenn die Zellsuspension auf dem Agar getrocknet war, wurde die Agarplatte bei 25 °C für 3 Tage inkubiert. Auf Grund des Stickstoffmangels des Mediums wurden die Zellen unterschiedlichen Paarungstyps angeregt miteinander zu einer Zygote zu verschmelzen. Die Zygote durchlief die Meiose und bildete zygotische Asken. Die Asken waren bananenförmig gebogen und enthielten jeweils vier haploide Sporen (Gutz *et al.*, 1974). Dieser Mechanismus erlaubt es der Hefe auch bei ungünstigen Lebensbedingungen als Spore zu überleben, die bei Nahrungszufuhr wieder zur vegetativen Form auskeimt.

Anschließend wurde vom Zellmaterial des Malzextraktmediums eine geringe Menge mit einer Impfnadel abgenommen und am Rand einer Vollmediumplatte dünn ausgestrichen. Diese Platte wurde dann für eine Stunde bei 25 °C inkubiert, um die Öffnung der Asken zu bewirken. Die Sporen des Askus wurden dann mit dem Mikromanipulator der Firma Singer auf einer Vollmedium Platte ausgelegt. Hierzu befindet sich am Gerät eine hauchdünne Nadel, mit der vier Sporen gemeinsam aufgenommen wurden und mit Hilfe des Geräts nebeneinander in einer Reihe ausgelegt wurden. Auf der Agarplatte konnten auf diese Weise bis zu 16 Tetraden ausgelegt werden. Die Vollmediumplatte wurde dann für mehrere Tage bei der für den Versuch entsprechenden Temperatur inkubiert.

#### Kopplungsgruppen-, und Genabstandsbestimmung

Nach der Keimung der Sporen und dem Wachstum zu Kolonien, wurde Zellmaterial der Tetradenkolonien mit Samtstempeln auf Malzextrakt-, Vollmedium und

verschiedene Minimalmedien, deren Zusammensetzung entsprechend der Ausgangsstämme gewählt wurde, übertragen. Anschließend wurden die Replikplatten für mehrere Tage bei entsprechenden Temperaturen inkubiert und wie im Ergebnisteil beschrieben ausgewertet.

#### Test auf synthetische Letalität zweier ts-sensitiver Allele (Kap. 3.1)

Die ausgelegten Tetraden werden bei der permissiven Temperatur für mehrere Tage inkubiert und das Wachstumsverhalten der Sporen eines Askus, wie im Ergebnisteil beschrieben, ausgewertet (Tab. 5.6).

**Tab. 5.6** Test auf synthetische Letalität der ts-Allele.

Kreuzung ts-Allele	Tetradenanzahl			Temperatur
	PD	NPD	T	
<i>prp1-4</i> × <i>prp4-73</i>	15	10	21	25 °C
<i>prp1-116</i> × <i>prp4-73</i>	38	11	21	25 °C
	9	3	6	30 °C
<i>zer1-C5</i> × <i>prp4-73</i>	27	10	6	25 °C
	3	16	23	30 °C
<i>cdc5-120</i> × <i>prp4-73</i>	35	6	20	25 °C
	7	2	9	30 °C
<i>prp5-1</i> × <i>prp4-73</i>	19	11	15	25 °C
<i>prp5-1</i> × <i>cdc5-120</i>	8	21	30	25 °C
<i>prp10-1</i> × <i>prp4-73</i>	2	4	2	25 °C
	6	28	19	RT
<i>prp10-1</i> × <i>prp5-1</i>	4	15	8	RT
<i>prp10-1</i> × <i>cdc5-120</i>	7	23	4	RT
<i>cdc28-P8</i> × <i>prp4-73</i>	-	alle Sporen bilden Kolonien (50 Tetraden)	-	25 °C

#### Bestimmung des Paarungstyps (Alfa *et al.*, 1993)

Nach der Keimung wurden die Tetraden durch Replikaplattierung auf 2 Malzextraktmediumplatten übertragen. Jede Platte wird mit einer Zellsuspension unterschiedlicher Hefestämme in NaCl Lösung (0,85 %) besprüht. Dabei enthält die eine Suspension Hefezellen eines  $h^+$ -Wildtypstammes und die andere Suspension die Zellen eines  $h^-$ -Wildtypstammes. Anschließend wurden die Platten für 3 Tage bei 25 °C inkubiert. Die Kolonien der Platte wurden nun mit Iod bedampft. Durch Iod färbt sich die Stärke der Sporenhüllen blau (Leupold, 1955). Es können nur Zellen entgegengesetzten Paarungstyps miteinander Zygoten und anschließend Askus bilden. Durch die Blaufärbung der Kolonien wurde sichtbar, welchem Paarungstyp die Sporen der ausgelegten Tetraden angehören.

### **5.10.2 Herstellung diploider *S.pombe* Zellen**

Zur Herstellung von diploiden *S.pombe* Zellen wurden stets zwei haploide Stämme mit verschiedenen Paarungstypen und den auxotrophen Marken *ade6-M210* und *ade6-M216* miteinander gekreuzt. Das *ade6* Gen kodiert für ein Enzym im

Adeninstoffwechsel. Eine Mutation im *ade6* Gen führt zur Anhäufung eines Zwischenprodukts im Adeninstoffwechsel, daß die Zellen im haploiden Zustand rot färbt. Dabei bilden haploide Zellen, die das *ade6-M210* Allel tragen dunkelrote Kolonien und haploide Zellen, die das *ade6-M216* tragen, bilden rosa gefärbte Kolonien. Diploide Zellen, die durch Kreuzung heterozygot für beide *ade6* Allele sind, bilden durch intragene Komplementation weiße Hefekolonien. Dieser Phänotyp wurde genutzt, um die diploiden Zellen selektionieren zu können.

Die haploiden Stämme mit den zwei verschiedenen *ade6* Allelen wurden gemeinsam in 50 µL NaCl Lösung (0,85 %) gelöst und gut durchmischt. Die Suspension wurde auf eine SPA-Mediumplatte, der Adenin zugefügt wurde aufgetropft und für 12 bis 16 Stunden bei 25 °C inkubiert. Vom Zellmaterial wurde in diesem Zeitraum jede Stunde jeweils ein Verdünnungsausstrich auf D-MMA und / oder auf EMM hergestellt und für mehrere Tage bei 25 °C inkubiert. Die gebildeten weißen Einzelkolonien enthielten die diploiden Zellen. Wenn bei der Kreuzung diploide Zellen mit homozygoten auxotrophen Marken hergestellt werden sollten, dann wurde dem SPA-Medium und auch dem D-MMA bzw. EMM entsprechende Supplemente zugefügt.

Für die Untersuchung, ob die Suppressormutationen *spp41* und *spp42* dominant über die Wildtypsuppressorgene sind (Kap. 3.2.6), wurde jeweils der Stamm HE 677 mit dem Stamm SL 7 bzw. SL 9 gekreuzt, um diploide Zellen zu erzeugen.

HE 677:  $h^{+N}$  *leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> ade6-M210*

SL 7:  $h^{-S}$  *leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> ade6-M216 spp42-1*

SL 9:  $h^{-S}$  *leu1-32 ura4-D18 prp4-73<sup>ts</sup> ade6-M216 spp41-2*

Die weißen diploiden Zellen wurden anschließend auf D-MMA ausgestrichen und für drei Tage bei 25 °C inkubiert. Die Kolonien wurden dann mit einem Samtstempel auf vier D-MMA-Platten gestempelt und bei verschiedenen Temperaturen auf ihr Wachstum getestet.

### 5.10.3 Zellzyklusarretierung mit Hilfe des *cdc10-129<sup>ts</sup>* Allels

Der Zellzyklus von *S. pombe* wurde in der G1-Phase des Zyklus arretiert (Alfa *et al.*, 1993). Dies war durch Einkreuzen des temperatursensitiven *cdc10-129*-Allels möglich. Das *cdc10* Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen reguliert, deren Produkte spezifisch in der G1-, und S-Phase des Zyklus benötigt werden. Der verwendete Stamm hatte folgenden Genotyp:

$h^{-S}$  *leu1-32 ura4-294 int::pRIPHAprp4<sup>+</sup> cdc10-129<sup>ts</sup>*

Zur Arretierung der Hefezellen wurden 800 mL leucinhaltiges Minimalmedium ohne Thiamin mit einer exponentiell wachsenden *S. pombe* Vorkultur auf eine OD von 0,07 angeimpft. Der Thiaminentzug bewirkt die Expression des HA-Prp4<sup>+</sup> Fusionsproteins, das unter Kontrolle des *nmt41*-Promotors im Genom des Stammes integriert vorliegt (mit Hilfe von pRIPHA42, Kap. 5.5.1). Die Kultur wurde bei 25 °C (permissive Temperatur) über Nacht inkubiert. Bei einer OD von 0,15 – 0,2 wurde die Kultur auf einen 36 °C Schüttler (restriktive Temperatur) umgesetzt und für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einem Eisbad auf 25 °C



heruntergekühlt, so daß die in der G1-Phase arretierten Zellen synchron den Zyklus durchlaufen konnten. Alle 10 Minuten wurde über 4,5h 26 mL der Kultur entnommen und davon 25 mL zur Aufarbeitung der Proteinextrakte und 1 mL zur Bestimmung der Zell-, und Septenanzahl verwendet. Die Proteine wurden nach der Beschreibung in Kapitel 5.9.1 aufgearbeitet, aufgetrennt und in einer Western-Blot-Analyse die Menge an HA-Prp4p im Extrakt bestimmt.

#### **5.10.4 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: Lokalisation von GFP-Prp4p und HA-Prp1p**

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation von GFP-Prp4p und HA-Prp1p in der Zelle bestimmt werden. Beide Konstrukte lagen integriert im Genom der Hefe vor. Das GFP-Prp4p wurde unter der Kontrolle des ribosomalen konstitutiven KD4-Promotors und gleichzeitig das HA-Prp1p unter der Kontrolle des *nmt41* Promotors exprimiert. Zur Kontrolle dienten Stämme, in denen nur das GFP-Prp4p unter der Kontrolle des *nmt1* Promotors exprimiert wurde und nur das HA-Prp1p unter der Kontrolle des *nmt41* exprimiert wurde. Die Herstellung der Konstrukte ist in Kapitel 5.5.1 bis Kap. 5.5.4 beschrieben.

Für die Bestimmung der Lokalisation der Fusionsproteine wurden für jeden Stamm 50 mL Minimalmedium mit den entsprechenden Supplementen und ohne Zugabe von Thiamin mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur der jeweiligen Stämme auf eine OD von 0,06 angeimpft und über Nacht bei 25 °C inkubiert.

#### Para-Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung (abgewandelt nach Hagan, & Hyams, 1988; Hagan, 1997)

Zum Nachweis der Fusionsproteine wurde der Kultur bei einer Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/mL 5 mL entnommen und mit 1,4 mL einer Para-Formaldehyd Lösung gemischt (3 g Para-Formaldehyd, in 10 mL PEM [0,1 M PIPES, 0,001 EGTA, 0,001 MgSO<sub>4</sub>] bei 65 °C gelöst; Zugabe von 20 Tropfen 5 N NaOH und weiter erwärmt bis die Lösung klar ist). Der Ansatz wurde für 30 Sekunden gut durchmischt und nach Zugabe von 20 µL Glutaraldehyd (50%) für 30 Minuten geschüttelt. Durch Para-Formaldehyd und Glutaraldehyd wurden die Zellen abgetötet und das Cytoskelett in seiner Struktur konserviert.

Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 mL PEM aufgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde nun für 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette entfernt und die Zellen nochmals mit 1 mL PEM gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 mL PEMS + Z (1 M Sorbitol in PEM gelöst, mit 0,5 mg/mL Zymolyase 100 T) aufgenommen und für 70 Minuten abgedunkelt bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Durch die Zymolyase wird die Zellmembran und die Kernmembran durchlässig für die Antikörper, die gegen die Fusionsproteine gerichtet sind.

Dann wurden die Zellen bei 13000 Upm für 4 Minuten abzentrifugiert, der Überstand mit der Pipette entfernt und das Pellet in 1 mL PEMS + T (1 M Sorbitol in PEM gelöst mit 1 µL Triton X-100/mL) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 700 µL einer Lösung aus 5 mL PEM und einer Spatelspitze Natriumborhydrid suspendiert und für eine Minute darin inkubiert. Durch Schnippen am Reaktionsgefäß wurden

die Schaumblasen aus der Flüssigkeit annähernd entfernt und der Ansatz für 4 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette anschließend entfernt und das Pellet mit 1 mL und dann mit 100 µL PEMBAL (1 % BSA – globin- und fettsäurefrei, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, 0,1 M L-Lysin in PEM-Puffer) gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 100 µL PEMBAL aufgenommen und für 30 – 60 Minuten abgedunkelt geschüttelt.

#### Antikörper-Inkubation

Die Zellen des Stamms, der gleichzeitig GFP-Prp4p und HA-Prp1p exprimiert, wurde zum Nachweis von HA-Prp1p mit 100 µL einer 1 : 400 Verdünnung (in Pembal) eines monoklonalen HA-Antikörpers (aus der Maus, BAbCO) abgedunkelt über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen des Stammes, der nur HA-Prp1p exprimiert, wurde mit der gleichen Verdünnung des HA-Antikörpers inkubiert. Die Zellen des Stammes, der nur GFP-Prp4p exprimiert, wurde mit 100 µL einer 1 : 1000 Verdünnung eines polyklonalen GFP-Antikörpers (aus dem Kaninchen, Clontech) abgedunkelt über Nacht auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Hefezellen 3 mal mit PEMBAL gewaschen und dann mit 100 µL einer Verdünnung des sekundären Antikörpers abgedunkelt über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden ein FITC markierter Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (Sigma) in einer 1: 100 Verdünnung und ein TRITC markierter Anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Sigma) in einer 1:50 Verdünnung verwendet.

Nach der Antikörper-Reaktion wurden die Zellen einmal mit 100 µL PEMBAL und einmal mit PBS-Puffer (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 – pro Liter) gewaschen.

#### DAPI-Färbung

Die DNA des Zellkerns wurde in den *S. pombe* Zellen durch Inkubation mit 100 µL Lösung aus 0,2 µg DAPI in PBS angefärbt. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in der Lösung suspendiert und sofort wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 40 µL PBS mit 0,1 % NaN<sub>3</sub> aufgenommen und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

#### Fluoreszenzmikroskopie

Die in PBS mit 0,1 % NaN<sub>3</sub> gelagerten Zellen wurden für die Mikroskopie auf ein Deckgläschen aufgetropft. Nach Antrocknen der Zellen wurden 10 µL einer Para-Phenylendiamin Lösung (10 µg/mL) mit 90 µL Glycerin (100 %) gemischt und ein Tropfen davon auf einen Objektträger pipettiert. Das Deckgläschen wurde nun mit den Zellen nach unten auf den Para-Phenylen/Glycerintropfen gelegt. Anschließend wurde das Präparat unter Fluoreszenzlicht mikroskopiert.

### **5.10.5 FACS-Analyse**

Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) von *S. pombe* Kulturen wurde mit einem FACS-Calibur Gerät der Firma Becton-Dickinson durchgeführt (Sazer, & Sherwood, 1990). Für die Messung wurde die Zellzahl der Proben durch Auszählen mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt und auf  $1 \times 10^7$  Zellen/mL

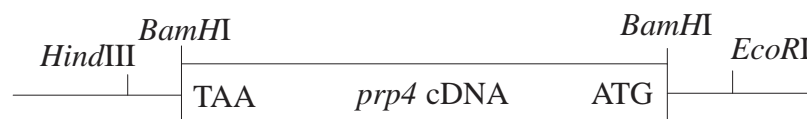
eingestellt. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten mit 2500 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 2 mL eiskaltem H<sub>2</sub>O aufgenommen und nochmals für 5 Minuten mit 2500 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 300 µL eiskaltem H<sub>2</sub>O aufgenommen und dann mit 700 µL 70 % EtOH vermischt. Nach dieser Fixierung wurden die Zellen bei – 80 °C eingefroren.

Für die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid wurden die aufgetauten Zellen mit 1 mL 0,05 M Natriumcitrat Lösung (pH 7 – 8) gewaschen. Nach dem Zentrifugieren für 5 Minuten mit 2500 Upm wurden die Zellen in 500 µL 0,05 M Natriumcitrat Lösung (pH 7 – 8, mit 1 mg/mL RNase A) aufgenommen und in ein lichtundurchlässiges 1 mL Reaktionsgefäß gegeben. Zum Abbau der RNA wurden die Zellen für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 450 µL 0,05 M Natriumcitrat Lösung und 50 µL 0,05 M Natriumcitrat Lösung mit 200 µg/mL Propidiumiodid zu den Proben gegeben. Die Färbung der Zellen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die FACS Messungen wurden am Tag nach der Färbung durchgeführt.

### 5.11 Gerichtete Mutagenese von *prp4* und *ubp21*

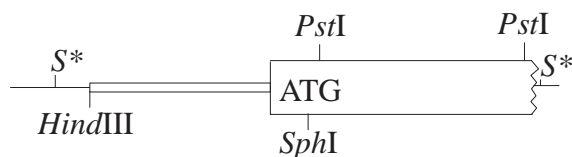
Die gerichtete Mutagenese von der *prp4* cDNA und eines chromosomalen *ubp21*-Fragmentes wurde mit dem MutaGene M13 *in vitro* Mutagenese Kit 2,0 der Firma Biorad durchgeführt. Das Kit ermöglicht die gezielte Mutagenese einer DNA-Sequenz mit Hilfe des Bakteriophagen M13 nach dem Verfahren von Kunkel *et al.* (1987). Die Mutagenese wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Mutagenese wurde die *prp4* cDNA (1,4 kb) (Beschreibung Kap. 5.5.1) in die *Bam*HI Schnittstelle des Vektors M13mp18 ligiert. Nach der Ligation lag das offene Leseraster der *prp4* cDNA in der Orientierung von *Hind*III (TAA) nach *Eco*RI (ATG) im Vektor vor (Abb. 5.11). Die Oligonukleotide wurden deshalb vom kodierenden Strang der cDNA Sequenz (*prp4* Gen, GenBank acc. no. L10739) abgeleitet.

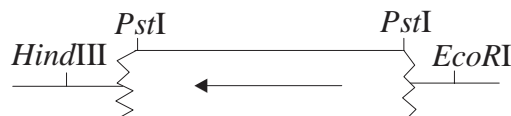


**Abb. 5.11** Schematisch Darstellung des Konstrukts M13mp18*prp4*<sup>+</sup>.

Für die Mutagenese von *ubp21* wurde das chromosomale *Pst*I-Fragment (1,4 kb) aus pAL18*ubp21-Hind*III Rel. (Abb. 5.12) in die *Pst*I-Restriktionsschnittstelle des Vektors M13mp18 ligiert. Nach der Ligation lag das Fragment in der Orientierung von *Hind*III zu *Eco*RI wie in Abb. 5.13 angegeben vor. Die Oligonukleotide wurden deshalb für die Mutagenese vom kodierenden Strang des Fragments (*ubp21* Gen, GenBank acc. no. CAC22603) abgeleitet.



**Abb. 5.12** Schematische Darstellung des Konstrukts pAL18ubp21-HindIII Rel..



**Abb. 5.13** Schematische Darstellung M13mp18ubp21-PstI Frag..

Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden so ausgewählt, daß durch die Mutagenese neue Restriktionsschnittstellen in *prp4* und im *ubp21*-Fragment entstanden, damit die Mutationen leichter nachgewiesen werden konnten. Die Sequenzen und Restriktionsschnittstellen der Oligonukleotide sind in der Tab. 5.7 angegeben.

**Tab. 5.7** Verwendete Oligonukleotide für die Mutagenese von *prp4* und *ubp21*.

Oligo	Sequenz	
M42	5`-CCGCCTGAAGTATCTCTTAAGCATCCTTTCTTT-3`	<i>Afl</i> II
M44	5`-CCGCCTGAAGTATCTTCGAAGCATCCTTTCTTT-3`	<i>Bst</i> BI
M50	5`-CCGCCTGAAGTATCTTCTAAGCTACCTTTCTTTATT-3`	<i>Bst</i> BI
M51	5`-CCGCCTGAAGTATCTTCGAAGCTAGCTTTCTTTATT-3`	<i>Nhe</i> I
M53	5`-CCGCCTGAAGTAGCTTTGAAGCTAGCTTTCTTTATT-3`	<i>Nhe</i> I
M60	5`-CGCGTACCGCCTGAAGTACTTTTGAAGGATGAATTCTTT-ATAA-3`	<i>Eco</i> RI
M61	5`-CGCGTACCGCCTGAAGTACTTGCTAAGGATGAATTCTTT-ATAA-3`	<i>Eco</i> RI
M62	5`-CGCGTACCGCCTGAAGTAATCATGAAGGAGCCTTTCTTT-ATAA-3`	<i>Bsp</i> HI
MHis	5`-TGTCCTAGTCCGCGGAGGTGATTTGCACGGCGGCCGTTA-TTATGCTC-3	<i>Sst</i> II
MCys	5`-CCAAGGTGCAACTAGTTATATGAACTCGCTA-3`	<i>Spe</i> I

Die Oligonukleotide wurden einzeln (bei *prp4*) oder wie bei der Mutation vom *ubp21*-Fragment in Kombination verwendet, um eine Doppelmutation zu erzeugen. M42 bis M62 wurden für die Mutation von *prp4* verwendet. MHis und MCys wurde für die Mutation des *ubp21*-Fragments verwendet.

Die Sequenzen der mutierten Konstrukte wurden durch eine Sequenzierung überprüft. Die *prp4*-Konstrukte mit den Mutationen wurden nach Umklonierung in den pUC19 in die *Bam*HI Schnittstelle des Vektors pRHA42S\* kloniert (Kap 5.5.1). Das *ubp21*-Konstrukt mit den Mutationen wurde in die *Pst*I Schnittstelle des *ubp21*<sup>+</sup> Gens im pAL18 (Abb. 5.11, Seite 82) subkloniert. Das Konstrukt wurde als pALubp21Ser/Arg bezeichnet und zur Retransformation in den *prp4-73<sup>ts</sup>* *prp4*-SSKLP Stamm verwendet (Kap. 3.3.4). Anschließend wurde das *Sph*I-*Hind*III Fragment in pQE31 umkloniert (Kap. 5.5.5) und zum Deubiquitinierungsaktivitätstest in Kap. 3.3.4 eingesetzt.

### 5.12 Test der Deubiquitinierungsaktivität von *ubp21*

Die Untersuchung der Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p und Ubp21p-Ser/Arg wurden im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  durchgeführt. Hierzu wurden kompetente DH5 $\alpha$  Zellen mit den pQE-*ubp21*-Konstrukten und mit jeweils beiden Substratkonstrukten kotransformiert. Als Kontrolle wurden die Substratkonstrukte ohne die pQE-*ubp21*-Konstrukte transformiert.

*Ubp21* und das mutierte Fragment *ubp21*-Ser/Arg wurden in die Bakterien-expressionsvektoren pQE32 bz. pQE31 kloniert (Beschreibung Kap. 5.5.5). Die Substratkonstrukte, die im Vektor pACYC184 kloniert vorlagen, kodieren für die Substratproteine Ub-Leu- $\beta$ -Gal und Ub-Met- $\beta$ -Gal.

Die Deubiquitinierungsaktivität von Ubp21p wurde durch Umsetzung von X-Gal durch das stabile  $\beta$ -Galaktosidase-Protein, daß nach Abspaltung des Ubiquitins vom Ub-Met- $\beta$ -Gal entsteht, durch die blau gefärbten *E. coli* Kolonien nachgewiesen. Dazu wurden 100  $\mu$ L X-Gal (20 mg/mL in Dimethylformamid gelöst) und 10  $\mu$ L IPTG (0,1 M) auf chloramphenicol-, und ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Die Transformation erfolgte wie im Kapitel 5.7.1 beschrieben. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Dokumentation wurden einzelne Kolonien als Batch auf Selektionsagar ausgestrichen.

### 5.13 Computerunterstützte Methoden

Der Vergleich von Nukleinsäure-, und Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm Blast 2.0<sup>3</sup> durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die Sequenzen der Datenbank des *S. pombe* Sequencing Projekts (PomBase) wurde nach Genen durchsucht, die möglicherweise eine Funktion beim Prä-mRNA Spleißen ausüben und für den *spp41*-, bzw. *spp42*- Suppressor kodieren könnten. Diese Datenbank ist am National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und am Sanger Centre (<http://www.sanger.ac.uk>) zugänglich.

Zur Erstellung der multiplen Alignments wurde das Programm PROSITE des ExPASy (Expert Protein Analysis System) Molecular Biology Server eingesetzt

(<http://www.expasy.ch>).

Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mit Hilfe der CELLQuest Software der Firma Becton Dickinson.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABOVICH, N., LEGRAIN, P., & ROSBASH, M. 1990. The yeast *PRP6* gene encodes a U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) protein, and the *PRP9* gene encodes a protein required for U2 snRNP binding. *Mol. Cell. Biol.*, **10** (12), 6417-6425.
- AJUH, P., KUSTER, B., PANOV, K., ZOMERDIJK, J. C. B. M., MANN, M., & LAMOND, A. I. 2000. Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J.*, **19** (23), 6569-6581.
- ALAHARI, S. K., SCHMIDT, H., & KÄUFER, N. F. 1993. The fission yeast *prp4<sup>+</sup>* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res.*, **21** (17), 4079-4083.
- ALFA, C., FANTES, P., HYAMS, J., MCLEOD, M., & WARBRICK, E. 1993. *Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- AVES, S. J., DURKACZ, B. W., CARR, A., & NURSE, P. 1985. Cloning, sequencing and transcriptional control of the *Schizosaccharomyces pombe cdc10* 'start' gene. *EMBO J.*, **4** (2), 457-463.
- BÄHLER, J., WU, J.-Q., LONGTINE, M. S., SHAH, N. G., MCKENZIE III, A., STEEVER, A. B., WACH, A., PHILIPPSEN, P., & PRINGLE, J. R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
- BARBET, N., MURIEL, W. J., & CARR, A. 1992. Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*, **114**, 59-66.



- BASI, G., SCHMID, E., & MAUNDRELL, K. 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promotor affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*, **123**, 131-136.
- BEACH, D. H., & KLAR, A. J. S. 1984. Rearrangements of the transposable mating-type cassettes of fission yeast. *EMBO J.*, **3**, 603-610.
- BOOHER, R. N., ALFA, C. E., HYAMS, J. S., & BEACH, H. D. 1989. The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation catalytic activity and nuclear localization. *Cell*, **58** (3), 485-497.
- BOTTNER, C. 2001. Untersuchungen zur Interaktion von Cdc5p und Prp5p in *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BROWN, N. G. M., WESTON, A., SAUNDERS, J. R., & HUMPHREYS, G. O. 1975. Transformation of *E.coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**, 219-222.
- BUJARD, H., GENTZ, R., LANZER, M., STÜBER, D., MÜLLER, M., IBRAHIMI, I., HÄUPTLE, M. T., & DOBERSTEIN, B. 1987. A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **155**, 416-433.
- BURGE, C. B., TUSCHL, T. H., & SHARP, P. A. 1999. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In: Gesteland R. F., Cech, T. R., Atkins J. F. (eds) *RNA World II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 525-560.



- COLLINS, C. A., & GUTHRIE, C. 1999. Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function of Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes Dev.*, **13**, 1970-1982.
- COLWILL, K., FENG, L. L., YEAKLEY, J. M., GISH, G. D., CÁCERES, J. F., PAWSON, T., & FU, X.-D. 1996. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.*, **271** (40), 24569-24575.
- EGEL, R. 1971. Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta*, **98**, 89-96.
- FORSBURG, S. L. 2001. The art and design of genetic screens: yeast. *Nature Reviews Genetics*, **2**, 659-668.
- GARCIA-HIGUERA, I., GAITATZES, C., SMITH, T.F., & NEER, E. J. 1998. Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13. *J. Biol. Chem.*, **273** (15), 9041-9049.
- GATERMAN, K. B., ROSENBERG, G. H., & KÄUFER, N. F. 1988. Double stranded sequencing, using mini prep plasmids. *Biotechniques*, **6**, 7.
- GOZANI, O., POTASHKIN, J., & REED, R. 1998. A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. *Mol. Cell. Biol.*, **18** (8), 4752-4760.
- GREEN, M. R. 1991. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **7**, 559-599.
- GROß, T. *Persönliche Mitteilung*. Institut für Genetik, TU Braunschweig.

- GUI, J.-F., TRONCHÈRE, H., CHANDLER, S. D., & FU, X.-D. 1994. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 10824-10828.
- GUARENTE, L. 1993. Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet.*, **9** (10), 362-366.
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U., & LOPRIENO, N. 1974. *Schizosaccharomyces pombe*. In: King, R. C. (ed) *Handbook of Genetics*, vol. 1. Plenum Press, New York, 395-446.
- HABARA, Y., URUSHIYAMA, S., TANI, T., & OHSHIMA, Y. 1998. The fission yeast *prp10<sup>+</sup>* gene involved in pre-mRNA splicing encodes a homologue of highly conserved splicing factor, SAP155. *Nucleic Acids Res.*, **26** (24), 5662-5669.
- HAGAN, I. 1997. Molecular genetics with *Schizosaccharomyces pombe*. Page 36 – 52 of: *EMBO Practical Course, June 8<sup>th</sup>-June 20<sup>th</sup>*. Department of Genetics, Institute of Molecular Biology, University of Copenhagen, DK.
- HAGAN, I. M., & HYAMS, J. S. 1988. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Science*, **89**, 343-357.
- HANKS, S. K., & HUNTER, T. 1995. Protein kinases. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*, **9**, 576-596.
- HOCHSTRASSER, M. *Persönliche Mitteilung*. Yale University, New Haven, Connecticut, USA.
- HOCHSTRASSER, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.

- HOFFMAN, C. S., & WINSTON, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- IMAMURA, O., SAIKI, K., TANI, T., OHSHIMA, Y., SUGAWARA, M., & FURUICHI, Y. 1998. Cloning and characterization of a human DEAH-box RNA helicase, a functional homolog of fission yeast cdc28/prp8. *Nucleic Acids Res.*, **26** (9), 2063-2068.
- KEENEY, J. B., & BOEKE, J. D. 1994. Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **136**, 849-856.
- KÄUFER, N. F. *persönliche Mitteilung*. Institut für Genetik. TU Braunschweig.
- KÄUFER, N. F., & POTASHKIN, J. 2000. Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res.*, **28** (16), 3003-3010.
- KRAMER, A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 367-409.
- KRAINER, A. R., & MANIATIS, T. 1985. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell*, **42**, 725-736.
- KOJIMA, T., ZAMA, T., WADA, K., ONOGI, H., & HAGIWARA, M. 2001. Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1. *J. Biol. Chem.*, **276** (34), 32247-32256.
- KUHN, A. N., LI, Z., & BROW, D. A. 1999. Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Mol. Cell*, **3**, 65-75.

- KUHN, A. N., & BROW, D. A. 2000. Suppressors of a cold-sensitive mutation in yeast U4 RNA define five domains in the splicing factor Prp8 that influence spliceosome activation. *Genetics*, **155**, 1667-1682.
- KUNKEL, T. A., ROBERTS, J. D., & ZAKOUR, R. A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, **154**, 367-382.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LAMB, J. R., TUGENDREICH, S., & HIETER, P. 1995. Tetra-trico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR ?. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 257-259.
- LAMM, G. M., & LAMOND, A. I. 1993. Non-snRNP protein splicing factors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1173**, 247-265.
- LANEY, J. D., & HOCHSTRASSER, M. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, **97**, 427-430.
- LE HIR, H., IZAURRALDE, E., MAQUAT, L. E., & MOORE, M. J. 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.*, **19** (24), 6860-6869.
- LE HIR, H., GATFIELD, D., IZAURRALDE, E., & MOORE, M. J. 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.*, **20** (17), 4987-4997.
- LEUPOLD, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R: Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.*, **24**, 381-480.

- LEUPOLD, U. 1955. Methodisches zur Genetik von *Schizosaccharomyces pombe*. *Schweiz Z. allg. Pathol. Bakteriol.*, **18**, 1141-1146.
- LIN, R. J., NEWMAN, A. J., CHENG, S. C., & ABELSON, J. 1985. Yeast mRNA splicing *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14780-14792.
- LOSSKY, M., ANDERSON, G. J., JACKSON, S. P., & BEGGS, J. 1987. Identification of a yeast snRNP protein and detection of snRNP-snRNP interactions. *Cell*, **51**, 1019-1026.
- LUNDGREN, K., ALLAN, S., URUSHIYAMA, S., TANI, T., OHSHIMA, Y., FRENDEWEY, D., & BEACH, D. 1996. A connection between pre-mRNA splicing and the cell cycle in fission yeast: *cdc28<sup>+</sup>* is allelic with *prp8<sup>+</sup>* and encodes an RNA-dependent ATPase/helicase. *Mol. Biol. Cell*, **7** (7), 1083-1094.
- MACMILLAN, A. M., QUERY, C. C., ALLERSON, C. R., CHEN, S., VERDINE, G. L., & SHARP, P. A. 1994. Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region. *Genes Dev.*, **8**, 3008-3020.
- MADHANI, H. D., & GUTHRIE, C. 1992. A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*, **71**, 803-817.
- MADHANI, H. D., & GUTHRIE, C. 1994. Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annu. Rev. Genet.*, **28**, 1-26.
- MAKAROV, E. M., MAKAROVA, O. V., ACHSEL, T., & LÜHRMANN, R. 2000. The human homologue of the yeast splicing factor Prp6p contains multiple TPR elements and is stably associated with the U5 snRNP via protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.*, **298**, 567-575.

- MAUNDRELL, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127-130.
- MAYEDA, A., BADOLATO, J., KOBAYASHI, R., ZHANG, M. Q., GARDINER, E. M., & KRAINER, A. R. 1999. Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO J.*, **18** (16), 4560-4570.
- MCDONALD, W. H., OHI, R., SMELKOVA, N., FRENDEWEY, D., & GOULD, K. L. 1999. Myb-related fission yeast Cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **19** (8), 5352-5362.
- MUNZ, P., WOLF, K., KOHLI, J., & LEUPOLD, U. 1989. Genetics overview. In *Molecular biology of the fission yeast* (ed. A. Nasim *et al.*), Academic Press, London, 1-30.
- MORENO, S., HAYLES, J., & NURSE, P. 1989. Regulation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase during mitosis. *Cell*, **58**, 361-372.
- MORENO, S., KLAR, A., & NURSE, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, **194**, 795-823.
- MURRAY, M. V. 1999. Role of phosphorylation in pre-mRNA splicing. *Frontiers of Hormone Research*, edited by S. L. Chew, Karger, London, **25**, 83-100.
- NASMYTH, K., & NURSE, P. 1981. Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **182** (1), 119-124.

- NEUBAUER, G., KING, A., RAPPSILBER, J., CALVIO, C., WATSON, M., AJUH, P., SLEEMAN, J., LAMOND, A., & MANN, M. 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat. Genet.*, **20**, 46-50.
- NILSEN, T. W. 1994. RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell*, **78**, 1-4.
- NISCHT, R., THUROFF, E., & KÄUFER, N. F. 1986. Molecular cloning of a ribosomal protein gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, **10** (5), 365-370.
- NURSE, P., THURIAUX, P., & NASMYTH, K. 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **146** (2), 167-178.
- OHI, R., MCCOLLUM, D., BILKIS, H., DEN HAESE, G. J., ZHANG, X., BURKE, J. D., TURNER, K., & GOULD, K. L. 1994. The *Schizosaccharomyces pombe cdc5<sup>+</sup>* gene encodes an essential protein with homology to c-Myc. *EMBO J.*, **13**, 471-483.
- OHI, R., FEOKTISTOVA, A., MCCANN, S., VALENTINE, V., LOOK, A. T., LIPSICK, J. S., & GOULD, K. 1998. Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* Cdc5p is structurally and functionally conserved in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.*, **18** (7), 4097-4108.
- OKAZAKI, K., OKAZAKI, N., KUME, K., JINNO, S., TANAKA, K., & OKAYAMA, H. 1990. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, **18** (22), 6485-6489.
- OHKURA, H., KINOSHITA, N., MIYATANI, S., TODA, T., & YANAGIDA, M. 1989. The fission yeast *dis2<sup>+</sup>* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, **16**, 997-1007.

- OPITZ, F. 2001. Isolierung und funktionale Charakterisierung von *prp5* und seinem Allel *prp5-1* – Untersuchungen zur Interaktion von Prp5p mit Prp4p. Diplomarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig.
- PADGETT, R. A., GRABOWSKI, P. J., KONARSKA, M. M., SEILER, S., & SHARP, P. A. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 1119-1150.
- PERKINS, D. D. 1949. Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics*, **34**, 607-626.
- POTASHKIN, J., DAEMYUNG, K., FONS, M., HUMPHREY, T., & FRENDEWEY, D. 1998. Cell-division-cycle defects associated with fission yeast pre-mRNA splicing mutants. *Curr. Genet.*, **34**, 153-163.
- REED, R. 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 215-220.
- RICHERT, K., SCHMIDT, H., GROß, T., & KÄUFER, N. F. 2002. The deubiquitinating enzyme Ubp21p of fission yeast stabilizes a mutant form of protein kinase Prp4p. *Mol. Gen. Genet.*, in Press.
- ROSENBERG, G. H., ALAHARI, S. K., & KÄUFER, N. F. 1991. *prp4* from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA splicing isolated using genes containing artificial introns. *Mol. Gen. Genet.*, **226**, 305-309.
- RUBI, S. W., & ABELSON, J. 1991. Pre-mRNA splicing in yeast. *Trends Genet.*, **7** (3), 79-85.
- RUEDIGER, R., HENTZ, M., FAIT, J., MUMBY, M., & WALTER, G. 1994. Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J. Virol.*, **68**, 123-129.



- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAZER, S., & SHERWOOD, S. W. 1990. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J. Cell Sci.*, **97**, 509-516.
- SCHMIDT, H. 1993. Effective long range mapping in *Schizosaccharomyces pombe* with the help of *swi5*. *Curr. Genet.*, **24**, 271-273.
- SCHMIDT, H., & GUTZ, H. 1994. The mating-type switch in yeasts. In: *Mycota I, Growth, Differentiation and Sexuality*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 283-294.
- SCHMIDT, H., RICHERT, K., DRAKAS, R. A., & KÄUFER, N. F. 1999. *spp42*, identified as a classical suppressor of *prp4-73*, which encodes a kinase involved in pre-mRNA splicing in fission yeast, is a homologue of the splicing factor Prp8p. *Genetics*, **153**, 1183-1191.
- SCHWELNUS, W. *Persönliche Mitteilung*, Institut für Genetik, TU Braunschweig.
- SCHWELNUS, W., RICHERT, K., OPITZ, F., GROß, T., YASUAKI, H., TANI, T., & KÄUFER, N. F. 2001. Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO reports*, **2** (1), 35-41.
- SHARP, P. A. 1994. Split genes and RNA splicing. *Cell*, **77**, 805-815.
- STÜBER, D., BANNWARTH, W., PINK, J. R. L., MELOEN, R. H., & MATILE, H. 1990 a. New B-cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* malaria circumsporozoite protein. *Eur. J. Immunol.*, **20**, 819-824.

- STÜBER, D., MATILE, H., & GAROTTA, G. 1990 b. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunological Methods*, Lefkovits, I. and Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press, New York, 121-152.
- SUN, J. S., & MANLEY, J. L. 1995. A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes Dev.*, **9**, 843-854.
- TANI, T. *Persönliche Mitteilung*, Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University Fukuoka, Japan.
- TEIGELKAMP, S., NEWMAN, A. J., & BEGGS, J. D. 1995. Extensive interactions of PRP8 protein with 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J.*, **14** (11), 2602-2612.
- TSAI, W. Y., CHOW, Y. T., CHEN, H. R., HUANG, K. T., HONG, R. I., JAN, S.-P., KUO, N.-Y., TSAO, T. Y., CHEN, C. H., & CHENG, S.-C. 1999. Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.*, **274** (14), 9455-9462.
- UMEN, J. G., & GUTHRIE, C. 1995. A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. *Genes Dev.*, **9**, 855-868.
- URUSHIYAMA, S., TANI, T., & OHSHIMA, Y. 1996. Isolation of novel pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 118-127.
- URUSHIYAMA, S., TANI, T., & OHSHIMA, Y. 1997. The *prp1*<sup>+</sup> gene required for pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein that contains TPR motifs and is similar to Prp6p of budding yeast. *Genetics*, **147**, 101-115.

- VALADKHAN, S., & MANLEY, J. L. 2001. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, **413**, 701-707.
- VARSHAVSKY, A. 1996. The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 12142-12149.
- VIJAYRAGHAVAN, U., COMPANY, M., & ABELSON, J. 1989. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **3** (8), 1206-1216.
- WANG, C., CHUA, K., SEGHEZZI, W., LEES, E., GOZANI, O., & REED, R. 1998. Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes Dev.*, **12**, 1409-1414.
- WILKINSON, K. D. 2000. Ubiquitination and deubiquitination: Targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 141-148.
- WILL, C. L., & LÜHRMANN, R. 1997. Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 320-328.
- WOOD, V. et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415** (21), 871-880.
- WU, J., & MANLEY, J. L. 1991. Base pairing between U2 and U6 snRNAs is necessary for splicing of a mammalian pre-mRNA. *Nature*, **352**, 818-821.
- ZURLINDEN, A., & SCHWEINGRUBER, E. M. 1997. Identification of a DNA element in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe nmt1 (thi3)* promotor involved in thiamine-regulated gene expression. *J. Bacteriol.*, **179** (18), 5956-5958.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzen

#### 7.1.1 Aminosäuresequenz von Prp4p

Aminosäuresequenz des Prp4p Proteins von *S. pombe* (GenBank acc. no. L10739).

1	MSDDRFAEDE	IIQQRKRRL	EILKKYQQTG	NGHSDLSIPE	40
41	KKLKEDVDQV	STTKPIEAVP	KMKTNASKIE	INKEGSNSNT	80
81	KLDVTNSTTS	DSPSIKSSVQ	IEDTEDDMFA	DSPSPSVKRQ	120
121	NTGKGISTLT	RSFADMQDNW	DDIEGYKVV	LMEELDSRYI	160
161	VQSNLGKGMF	STVVSALDRN	RNQTFAIKII	RNNEVMYKEG	200
201	LKEVSILERL	QAADREGKQH	IIHYERHFMH	KNHLCMVFEM	240
241	LSLNLRDILK	KFGRNVGLSI	KAVRLYAYQM	FMALDLLKQC	280
281	NVIHSDIKPD	NMLVNEKRNI	LKICDLGSAS	DASENEITPY	320
321	LVSIFYRAPE	IILGFPYSCP	IDTWSVGCSL	YELYTGQILF	360
361	PGRTNQMLR	YMMECKGKFS	HKMLKRSQFL	NDHFDADFNF	400
401	IQIDHDPITN	QETRPVKFS	KPTKDIRSRL	KEVPTSTDEE	440
441	FIIRQELMDL	LEKCLELNPE	KRVPPEVALK	HPFFIKK	477

Das konservierte ALKHP-Motiv, das durch Mutagenese verändert worden ist, wurde durch eine Linie oberhalb der entsprechenden Sequenz markiert.

#### 7.1.2 Aminosäuresequenz von Ubp21p

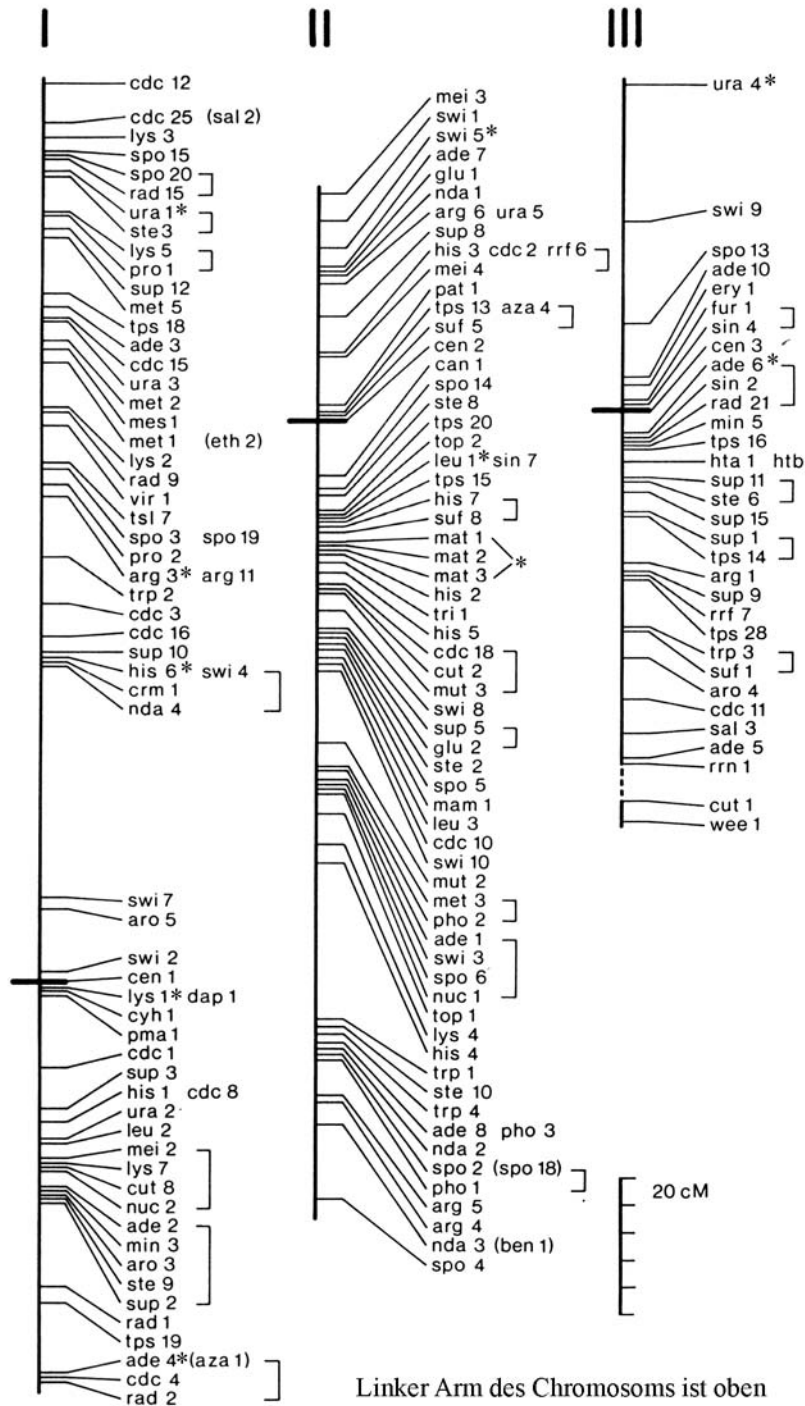
Aminosäuresequenz des Ubp21p Proteins von *S. pombe* (GenBank acc. no. CAC22603, *ubp21* ist in GenBank als *ubpD* bezeichnet).

1	MVLSNVDAEE	VNMDSSMELE	ESSQEPLRAD	NYEEIYNLSV	40
41	HHEPDLEEA	HASYSWVVK	FSTLEDKTYS	PLFKAQHITW	80
81	RIVLFPKGCN	QTEYASVFLE	YLPQCKVEAI	RKYEAELAAG	120
121	KTPTIDPEIV	NDETYSCCAQ	FALSLSNVQD	PTVMQINTSH	160

161	HRFRSEVKDW	GFTRFVDLRK	IAVPTPEFPV	PFLENDEICI	200	
201	SVTVRVLQDP	TGVLWHSFVN	YNSKKETGYV	<u>GLKNQGAT</u> <b>CY</b>	240	Cys
241	<u>MNSLLQSLFF</u>	TNIFRKTIVYK	IPTDNDDSRD	SVAYALQRVF	280	
281	YNLEKQREPV	STTELTRSFG	WNSFDSFMQH	DIQEFNRVLQ	320	
321	DNLEKKMKGT	EVENALNDIF	VGKMKSIVKC	IDVNYESSRV	360	
361	EDFWDIQLNV	KGMDTLEDSF	RDAIQVETLT	GNKYAEGH	400	
401	GLQDAHKGII	FESLPNVLQL	QLKRFDYDML	RDMMVKINDR	440	
441	HEFPLEIDLE	PYLSETADKS	<u>ESHVYVLHGV</u>	<u>LV</u> <b>HGGDLHGG</b>	480	His
481	<u>HYYALIKPEK</u>	<u>DSNWFKFDDD</u>	RVTRATIKEV	LEDNYGGGPA	520	
521	GRAKGYNGNP	FKRFMNAYML	VYFRKSRLDH	ILSPVTAEDV	560	
561	PFHVRNTLDE	EHRVVERKLL	EREEQQIYRR	VRVLTDTGFK	600	
601	KYHGFDMTDF	SASDDDPVLI	TTKIKRNANI	WDLQKHLAGL	640	
641	LNRDTSGIRI	WLMTNRQNRT	VRVDLPLDKK	TILVDQICDM	680	
681	HIRKDMDMRV	YVEFLSEHNQ	LLADFGATDD	NDFDTYIFLK	720	
721	IFDYETQQIS	GLADLHVSKN	SPISSLSEWI	REHLKWSSDV	760	
761	PITYYEEIKT	GMVDVLDPNA	SFEKSEIQVG	DIICFEKKLV	800	
801	HDSSSDTSHP	YKSALDLYDF	MAHRVVITFE	PRYSDDTNGG	840	
841	VFDLVLTTHT	NYTDMARAVA	NKLNVDPNYL	QFTMAHLPSR	880	
881	TPRSVIRNPS	KFTLQNAIPS	TYSHNQNVVM	FYEVLDTLS	920	
921	ELERKQLIRV	HFLSNGISHE	TQMEFYVDKE	GTVEDILRQV	960	
961	TQKVPLNAED	ASRLRLYEVY	NHRILKSHLP	TDGIYDLNEF	1000	
1001	STAYVEVTPK	EEQMQLKTDD	AVSIVVQHFF	KDLSRLHDIP	1040	
1041	FYFVLLRGET	LKDLKKRLQK	RLGYNDTQFS	KVKLAVLQAQ	1080	
1081	SFGKPYLTD	DDEVLYGELE	PQSHILGLDH	PPANGSAQYH	1120	
1121	GMDQAIRMK				1129	

Die Sequenz der Cys-Box und der His-Box von Ubp21p wurde durch eine Linie oberhalb der entsprechenden Sequenz markiert. Konservierte Aminosäurereste, einschließlich des Cysteins und der beiden Histidine wurden in der Cys-, und His-Box unterstrichen bzw. fett geschrieben.

## 7.2 Genetische Karte von *S. pombe*



Die Karte wurde aus Munz *et al.* (1989) entnommen und verändert. Die Chromosomen sind mit römischen Zahlen bezeichnet. Das Zentromer wurde durch eine dicke waagerechte Linie markiert. Markergene, die in dieser Arbeit zur Tetradenanalyse verwendet wurden, wurden durch Sternchen markiert.